

MESTRADO
MEDICINA LEGAL

**Perfil de microRNAs:
Potenciais Biomarcadores de
Identificação de Amostras Biológicas**
Andreia Filipa Carvalho Ribeiro

M
2018



ANDREIA FILIPA CARVALHO RIBEIRO

PERFIL DE MICRORNAS: potenciais biomarcadores de identificação de amostras biológicas

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientador: Doutora Ana Luísa Pereira Teixeira

Categoria: Investigadora de Pós-Doutoramento

Afiliação: Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

Coorientador: Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

Categoria: Professor Afiliado

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e Coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

Coorientador: Mestre Francisca Dias

Categoria: Aluna de Doutoramento

Afiliação: Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

INFORMAÇÃO TÉCNICA

TÍTULO:

Perfil de microRNAs: potenciais biomarcadores de identificação de amostras biológicas

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Medicina Legal, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

AUTOR: Andreia Filipa Carvalho Ribeiro

DATA: setembro de 2018

EDITOR: Andreia Filipa Carvalho Ribeiro

MORADA: Rua do Rio, nº510

LOCALIDADE: Fregim, Amarante

CÓDIGO POSTAL: 4600-593 Amarante

CORREIO ELETRÓNICO: afiliparibeiro3@gmail.com

1º EDIÇÃO: setembro de 2018

Aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

Ao concluir esta etapa do meu percurso académico, não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que contribuíram, de forma direta e indireta, para a execução deste projeto.

Em primeiro lugar agradeço à minha orientadora, Doutora Ana Luísa Teixeira, pela oportunidade em desenvolver este projeto. Agradeço todo o apoio, toda a supervisão e orientação, os conselhos e todas as sugestões, e ainda a confiança e o interesse neste projeto.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Rui Medeiros, pela oportunidade e privilégio da concretização deste projeto.

À minha coorientadora, Mestre Francisca Dias, o meu sincero agradecimento por todo o apoio e disponibilidade constantes. Muito obrigada pelo tempo dedicado à minha orientação e ao projeto, pelo incentivo e motivação, por toda a ajuda, pelas sugestões e ideias que se tornaram indispensáveis para a realização deste projeto. Agradeço ainda toda a simpatia e a paciência com que me transmitiu os seus conhecimentos.

Agradeço à Professora Maria José Pinto da Costa, Diretora do Mestrado em Medicina Legal, a oportunidade de ingressar neste mestrado, assim como todos os conhecimentos transmitidos.

A todo o Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Instituto Português de Oncologia do Porto, pela simpatia e pela disponibilidade. Muito obrigada, em especial, à Mariana Morais e à Mara Fernandes, pela integração no grupo e no laboratório, pela ajuda indispensável e pelo esclarecimento de qualquer dúvida, ao longo deste projeto.

Agradeço também a colaboração e contribuição de todos os doadores de sangue, sem os quais a realização deste projeto não teria sido possível.

Aos meus amigos, pela presença e por todo o apoio moral durante a elaboração deste trabalho. Por todos os conhecimentos, dúvidas e esclarecimentos partilhados, e acima de tudo, pelos momentos de descontração e boa disposição.

Aos meus pais, por todo o apoio incondicional e pelos incentivos. Por sempre acreditarem nas minhas capacidades, por estarem sempre disponíveis para me ajudarem, e principalmente, por todos os sacrifícios que fizeram por mim.

Ao meu namorado, pela preocupação e cumplicidade constantes. Por todo o apoio e ajuda, por acreditar sempre em mim, e também pela boa disposição e pelos momentos de descontração.

A todos, muito obrigada.

ABREVIATURAS

A

AGO Argonauta

C

cDNA DNA complementar

Ct Cycle threshold

D

DNA Ácido desoxirribonucleico

DGR8 *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*

dNTP Desoxirribonucleótidos trifosfato

dsRNA *Double-stranded ribonucleic RNA*

H

HDL *High-density lipoprotein*

M

miR microRNA

miRNA microRNA

mL Mililitro

mRNA RNA mensageiro

N

ncRNA *Non-coding RNA*

P

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-mRNA	miRNA primitivo

Q

qPCR	<i>Real-time PCR</i>
------	----------------------

R

RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RNA Pol II	RNA Polimerase II
RNA Pol III	RNA Polimerase III
RNU	<i>Small-nuclear RNA</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real

T

TRBP	<i>Transactivation-responsive RNA-binding protein</i>
------	---

U

UV	Ultravioleta
µL	Microlitro

X

XPO5	Exportina-5
------	-------------

ÍNDICE

ABSTRACT	13
RESUMO.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Caracterização de Fluídos Biológicos em Medicina Legal	20
1.2. microRNAs	22
1.3. Aplicabilidade dos miRNAs na Medicina Legal	24
1.4. miRNAs como potenciais biomarcadores de identificação de amostras de sangue	26
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo Principal.....	31
2.2. Objetivos Específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. População de Estudo.....	33
3.2. Processamento de Amostras.....	33
3.3. Extração de microRNAs.....	35
3.4. Síntese de cDNA e quantificação relativa por PCR em tempo real	36
3.5. Análise Estatística	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Variação do aspeto macroscópico das amostras de sangue periférico	39
4.2. Quantidade de RNA total nos diferentes suportes	40
4.3. Seleção do controlo endógeno	42
4.4. Níveis de miR-451, miR-16 e miR-223 nos diferentes suportes físicos	44
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	54
7. REFERÊNCIAS	57
8. ANEXOS.....	61
8.1. Anexo 1	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da biogénese de miRNAs.	24
Figura 2 - Revisão de todos os miRNAs considerados possíveis biomarcadores de fluídos biológicos (adaptada de S. Silva et al (13)).	27
Figura 3 - Desenho do procedimento experimental.	34
Figura 4 – Esquemas utilizados nos suportes madeira e pedra (A) e no suporte algodão (B) para recolha da amostra de sangue nos diferentes tempos estabelecidos para a experiência.	35
Figura 5 - Variação do estado das manchas de sangue nos suportes algodão, pedra e madeira ao longo do tempo.	36
Figura 6 - Detecção da quantidade de RNA total, ao longo dos diferentes tempos de exposição, no suporte tecido de algodão.	36
Figura 7 - Detecção da quantidade de RNA total, ao longo dos diferentes tempos de exposição, no suporte pedra.	36
Figura 8 - Detecção da quantidade de RNA total, ao longo dos diferentes tempos de exposição, no suporte tecido de madeira.	36
Figura 9 - Média dos Ct's dos RNU44 e RNU48 nos diferentes suportes (algodão, pedra e madeira) e tempos de exposição (fresco, 24h, 48h, 1 semana, 2 semanas e 1 mês).	36
Figura 10 – Níveis de expressão relativa dos miR-451, miR-16 e miR-223 nos diferentes tempos de exposição, no suporte algodão (média ± erro da média).	36
Figura 11 – Níveis de expressão relativa dos miR-451, miR-16 e miR-223 nos diferentes tempos de exposição, no suporte pedra (média ± erro da média).	36
Figura 12 – Níveis de expressão relativa dos miR-451, miR-16 e miR-223 nos diferentes tempos de exposição, no suporte madeira (média ± erro da média).	36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de Fluídos Biológicos (Adaptada de Virkler et al. (2)).	20
Tabela 2 - Limitações atuais existentes associadas à identificação de fluídos biológicos.	21
Tabela 3 - Características que um biomarcador ideal num biomarcador ideal deve apresentar para ser usado na identificação de fluídos biológicos (11) (31).	25

_____**ABSTRACT**_____

ABSTRACT

The identification of biological fluids, existing in several forensic scenarios, is crucial to the Forensic Sciences, once it can help in the resolution of a criminal investigation. In most of the cases, biological samples are hard to identify and even when their identity may seem obvious, its necessary to ensure its confirmation. Despite being one of the most frequent biological fluid found in forensic scenarios, the blood identification techniques that are more frequently used, have several limitations including a low accuracy and sensitivity, often leading to false-positive results. Therefore, one of the main Forensic Science's challenge is to find an accurate identification tool that can be used as a reliable and fast way to establish the identity of a biological sample. As such, new methodologies appeared with the capacity of studing nucleic acids as potential biological fluid's identification tool. Recently, it was found that the tissue-specific expression of microRNAs (miRNAs) and their intrinsically short fragment make them ideal biomarkers in the forensic identification of body fluids. MiRNAs belong to a small group of non-protein coding molecules of RNA, with 18 to 25 nucleotides, that regulate gene expression in post-transcriptional levels. However, until the present day, there is not a specific and validated miRNAs profile capable of specifically identify blood samples.

The main objective of this study is to validate the potential of miRNAs-16, -223 and -451 as identification biomarkers of peripheral blood samples. In the present study, we evaluate the expression levels of the three miRNAs, in blood stains derived from four individuals (two women and two men) that were deposited in different materials (cotton, stone and wood), tested in different timepoints (24 hours, 48 hours, 1 week, 2 weeks and 1 month) at room temperature.

Following a review of the literature and the selection of the miRNAs, we created experimental scenarios where the peripheral blood samples were deposited in the mentionated materials during the different timepoints. After each timepoint, the samples where collected, processed and the miRNAs were extracted. Subsequently, complementary DNA (cDNA) synthesis and quantitative real-time PCR were performed, followed by a statistical analysis of the obtained results with the software *IBM®SPSS®Statistics* to Windows (Version 22.0).

All the tested miRNAs were detected in all timepoints and materials. In the quantification of the total existing RNA, we verified that in all different time points that we used, its possible to detect miRNAs with good efficiency. The endogenous control used for normalization was RNU48, since it presented the lowest variation among all the different materials. After nornalization we observed the relative expression levels of miR-

16, -451 and -223 in the different timepoints and different materials, and we concluded that the miRNA with the highest expression level in two of the three materials was miR-16. MiR-451 also presented high expression levels in all materials and miR-223 was the miRNA whose expression levels were the lowest among all the materials.

The present study observed that the miRNAs can be detected in blood stains no matter the timepoint when they are processed, maintaining quality and quantity in all materials. That gives a huge advantage to Forensic Sciences since that there is no time pressure to the miRNA analysis. Besides, the high and constant expression levels of miR-16 in all different tested materials show us that this is a stable biomarker to identify blood samples. Also, miR-451 showed to be a potential marker for blood samples. miR-223 presented results where the low expression level made us conclude that it is not a good biomarker for the identification of blood samples. The types of materials that were used did not difficult the detection of miRNAs.

We can conclude that miR-16 and -451 presented characteristics that make them potential biomarkers for the identification of peripheral blood, validating the results of previous studies. Additionally, and most importantly, we observed that all miRNAs were detectable in blood stains deposited in three different materials even after a month. However, due to its low expression levels, miR-223 may not be a reliable for blood stain identification since it may not be detectable in some cases.

MiRNAs present a high potential of detection in biological fluids, and could turn a new approach to the identification of biological fluids stains. In the nearby future, the same miRNAs should be tested in stains of mixtures of biological fluids, using a larger sample of individuals, and other materials.

-----**RESUMO**-----

RESUMO

A identificação de fluídos biológicos existentes em diversos cenários forenses é crucial para a Medicina Legal, uma vez que pode auxiliar na resolução de uma investigação criminal. Geralmente, as amostras biológicas são difíceis de identificar, porém, mesmo quando a sua identidade parece ser óbvia, é necessária a confirmação recorrendo a testes científicos. O sangue é um dos fluídos biológicos mais frequentemente encontrados em cenários forenses, no entanto, os métodos convencionais de identificação utilizados apresentam várias limitações, incluindo uma baixa especificidade e sensibilidade, podendo conduzir a resultados falsos-positivos. Deste modo, um dos principais desafios da Medicina Legal é a procura de um biomarcador preciso, rápido e fiável que seja útil no estabelecimento da identidade de uma amostra biológica. Nos últimos anos surgiram novas metodologias que incluem o estudo de ácidos nucleicos como potenciais candidatos a biomarcadores de fluídos biológicos. Nomeadamente, observou-se que o pequeno tamanho e a expressão específica nos tecidos dos microRNAs (miRNAs) os tornam potenciais candidatos a biomarcadores úteis na identificação de fluídos biológicos. Os miRNAs pertencem a uma família de pequenas moléculas de RNA não codificante, com tamanho de 18-25 nucleótidos, de cadeia simples, que regulam a expressão de genes a nível pós-transcricional. No entanto, até ao presente, não existe um perfil de miRNAs específico e validado que permita o estabelecimento da identificação específica de amostras de sangue periférico.

O objetivo principal do presente estudo foi a validação do potencial dos miRNAs-16, -223 e -451 como biomarcadores de identificação de amostras de sangue periférico. Neste estudo, avaliou-se o padrão de expressão destes miRNAs a partir de amostras de sangue periférico depositadas em diferentes suportes (tecido de algodão, pedra e madeira), em diferentes tempos de exposição à temperatura ambiente (amostra a fresco, 24 horas, 48 horas, 1 semana, 2 semanas e 1 mês).

A cada tempo de exposição, as amostras foram recolhidas através de zaragatoas, processadas e os miRNAs extraídos. Posteriormente, foi realizada a síntese de DNA complementar e, de seguida, os miRNAs foram analisados por PCR quantitativo em tempo real.

Todos os miRNAs analisados foram detetados em todos os tempos de exposição e em todos os suportes utilizados. Na quantificação de RNA total existente verificou-se que em qualquer um dos tempos de exposição é possível recuperar esta molécula em

elevada quantidade e com uma qualidade adequada à sua subsequente análise molecular. Verificamos também que o controlo endógeno RNU48 era o que apresentava menor variação do valor de Ct, nos diferentes tempos e nas diferentes condições experimentais, tendo sido o selecionado para posterior normalização dos resultados.

Ao se observar a expressão relativa dos miR-16, -451 e -223, concluímos que o miRNA que apresentava maior nível de expressão em dois dos três suportes foi o miR-16. No entanto, o miR-451 também apresentava níveis de expressão relativa elevados em todos os suportes. De facto, o miR-223 era o que apresentava níveis de expressão relativa baixos. Assim sendo, o que apresentava maior estabilidade nos três suportes era o miR-16.

O presente estudo verificou que há deteção de RNA seja quando se processa amostras biológicas de imediato, ou quando se processa após 1 mês, com boa qualidade e quantidade nos diferentes suportes. Isto confere uma grande vantagem à medicina legal, uma vez que em casos em que não se sabe há quanto tempo foi cometido o crime, não existe a pressão do tempo a impedir a análise aos miRNAs. Para além disto, os níveis de expressão elevados e constantes do miR-16 nos diferentes suportes testados mostraram que este é um biomarcador estável para a identificação de amostras de sangue. Para além do miR-16, também o miR-451 mostrou ser um potencial marcador para amostras de sangue. Quanto ao miR-223, os resultados mostraram que apesar de estável, este parece não ser o melhor para se utilizar como biomarcador de amostras de sangue. O tipo de suporte utilizado não dificulta a deteção de miRNAs.

Após os resultados obtidos, é possível concluir que os miR-16 e -451 apresentam características que os tornam potenciais biomarcadores de identificação de amostras de sangue, validando-se assim os resultados obtidos de estudos anteriores. No entanto, podemos afirmar que o miR-16 é mesmo um biomarcador estável para identificar amostras de sangue. Quanto ao miR-223, este não será um potencial biomarcador para amostras de sangue, mas pode ser um potencial biomarcador para identificar outros fluídos biológicos. No entanto, no futuro, devem ser propostos novos estudos em que sejam eliminados os vieses do estudo presente, e, para além disto, testar os miRNAs que foram utilizados neste estudo, numa mistura de fluídos, com maior número de indivíduos e em outro tipo de suportes.

Os miRNAs apresentam um elevado potencial na deteção de miRNAs em fluídos biológicos, podendo vir a tornar-se numa nova abordagem a utilizar nos laboratórios forenses, para a identificação de amostras biológicas com interesse forense.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A identificação de fluídos biológicos é uma componente muito importante na área das ciências forenses uma vez que pode auxiliar na determinação da natureza de um crime ou até mesmo ser a chave para resolver uma investigação criminal, sendo posteriormente invocada em tribunal (1).

Na maior parte dos casos, as amostras biológicas que existem são invisíveis, encontram-se presentes em pequenas quantidades, misturadas ou degradadas, o que pode tornar a sua identificação mais complexa (1). Porém, mesmo quando a identidade da amostra biológica parece ser óbvia para o técnico forense, é necessária uma confirmação absoluta (2).

Os fluídos de maior interesse para as ciências forenses incluem o sangue, sémen, sangue menstrual, urina e saliva. Contudo, para que possa ser possível identificá-los, são precisos testes sensíveis, fáceis de utilizar, específicos para os diferentes fluídos biológicos e que não destruam o material genético (1). Nas últimas décadas, os métodos convencionais utilizados na identificação de fluídos biológicos são baseados na utilização de ensaios químicos e enzimáticos e em testes confirmatórios, que incluem testes microscópicos e imunológicos. Contudo, estes apresentam várias limitações como baixa sensibilidade e especificidade (1–6).

Desta forma, atualmente, uma das grandes dificuldades da Medicina Legal está relacionada com a falta de biomarcadores fiáveis e a ausência de um método preciso e rápido que permita uma rápida identificação dos fluídos biológicos (7–9). Como tal, os ácidos nucleicos foram utilizados em vários estudos para serem testados como possíveis biomarcadores, e entre eles o ácido desoxirribonucleico (DNA), o RNA mensageiro (mRNA) e os microRNAs (miRNAs).

Em investigações forenses, a determinação do perfil de DNA permite a identificação de indivíduos através da sua respetiva assinatura de DNA, no entanto, não permite a identificação do tipo ou da origem de uma amostra biológica (7). Para além disto, a quantidade de DNA existente numa cena de crime pode ser insuficiente ou esta molécula estar degradada, o que a torna instável e sem utilidade (7,10). Para além deste ácido nucleico, e tendo em conta que cada tipo de tecido corporal apresenta uma distinta assinatura de ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*: RNA), o perfil de mRNA apareceu como um procedimento vantajoso para a identificação relevante de fluídos biológicos. Porém, a sua suscetibilidade à degradação por fatores químicos e físicos é problemática, limitando a sua utilização (7,11). Esta limitação poderá ser ultrapassada com o estudo de miRNAs, cujo tamanho pequeno e a sua expressão específica entre tecidos faz deles

biomarcadores ideais para a identificação de fluídos biológicos na área das ciências forenses (9,12).

1.1. Caracterização dos Fluídos Biológicos

As amostras biológicas encontradas nos diferentes cenários forenses desempenham um papel fundamental nas investigações forenses uma vez que fornecem provas valiosas. A presença de certos fluídos biológicos pode ser usada como um indicador preciso da sequência dos eventos ocorridos e uma vez recolhidos e analisados, podem fornecer informação que conduz à identificação de indivíduos envolvidos. Por exemplo, manchas de sangue podem indicar alguma forma de luta física, assalto ou homicídio; e a detecção de sémen ou fluídos vaginais podem ser indicativos da ocorrência de abuso sexual (13).

Tal como já foi referido, entre os fluídos biológicos mais comuns em cenas de crime encontram-se o sangue, sémen, saliva, fluídos vaginais, urina e suor (13). Apesar de cada fluído biológico apresentar uma composição única, existem alguns componentes comuns entre fluídos, como é o caso do cloro que se encontra presente no suor, urina e sémen ou do ácido láctico que se encontra presente no suor, fluído vaginal e sémen (Tabela 1) (2).

Tabela 1 - Composição de Fluídos Biológicos (Adaptada de Virkler et al. (2)).

Sangue	Sémen	Saliva	Fluído Vaginal	Urina	Suor
Hemoglobina	Fosfatase ácida	Amilase	Fosfatase ácida	Ureia	Ureia
Fibrinogénio	Antigénio específico da próstata	Lisozima	Ácido Láctico	Creatinina	Ácido Láctico
Eritrócitos		Mucina	Ácido Cítrico	Ácido Úrico	Cloro
Albumina	Espermatozoides	Células epiteliais bucais	Ureia	Cloro	Sódio
Glucose	Cloro		Peptidase vaginal	Glicoproteína	Potássio
Imunoglobulinas	Espermina	Tiocianato	Células epiteliais glicogenadas	Tamm-Horsfall	Imunoglobulinas
	Semenogelina	Potássio	Ácido Acético		
	Zinco	Bicarbonato	Piridina		
	Ácido Cítrico	Fósforo	Esqualeno		
	Ácido Láctico	Glucose	Imunoglobulinas		
	Frutose	Imunoglobulinas			
	Ureia				
	Ácido Ascórbico				
	Imunoglobulinas				

Ao longo dos anos, vários tipos de métodos de identificação de fluídos biológicos foram desenvolvidos, como testes químicos, testes imunológicos, testes de atividade catalítica de proteínas e métodos microscópicos e espectroscópicos (11,13). Contudo, estes métodos convencionais de identificação de fluídos biológicos são, na sua maioria, presuntivos e são realizados para um único fluído biológico de cada vez. Para além disso, estes métodos apresentam algumas limitações, presentes na Tabela 2 (11,13).

Tabela 2 - Limitações atuais existentes associadas à identificação de fluídos biológicos.

Limitações da identificação de Fluídos Biológicos
<p>Custo elevado</p> <p>Perda de elevada quantidade de amostra</p> <p>Baixa especificidade e sensibilidade</p> <p>Destruição da amostra analisada</p>

A utilização de métodos convencionais depende ainda da quantidade de material biológico disponível, sendo que os resultados obtidos poderão ainda ser influenciados pela exposição a fatores ambientais como a humidade ou alterações da temperatura, que podem contribuir para a destruição da amostra (13).

De forma a resolverem os problemas dos métodos convencionais, surgiram novas abordagens moleculares baseadas no estudo de ácidos nucleicos (12).

A utilização do DNA como biomarcador na identificação de fluídos biológicos apresenta várias limitações, entre as quais a falta de material genético suficiente para se obter um perfil de DNA, e ainda o facto de, na maior parte das vezes, esse material se encontrar degradado (10). Para além disto, o DNA isolado será igual em todos os fluídos biológicos que pertençam ao mesmo indivíduo, sendo, portanto, um método desadequado para a identificação de fluídos biológicos (10).

Atualmente, a identificação de fluídos biológicos através da quantificação de mRNA é uma técnica utilizada em vários laboratórios forenses e foi proposta como um método sensível e específico para a identificação de fluídos biológicos. Verificou-se que é possível a deteção de mRNA em amostras biológicas após longos períodos de armazenamento em condições secas e à temperatura ambiente (12,14). Zubakov e colaboradores realizaram um estudo em que verificaram que alguns marcadores de mRNA, com padrões de expressão específicos para sangue, eram estáveis o suficiente para identificar manchas de sangue até 180 dias. As amostras foram colocadas em

condições não húmidas, sem poeira, mas sujeitas à luz do dia normal em diferentes tempos de exposição. De seguida, eram armazenadas a -80°C até ao isolamento do RNA (15). Adicionalmente, num outro estudo, estes autores, testaram o comportamento dos mesmos marcadores em sangue mais antigo (13 a 16 anos), em que as amostras foram colocadas à temperatura ambiente, em condições não húmidas (submetidas à luz do dia normal), e sem poeira durante os 13 a 16 anos até ao isolamento do RNA. Concluíram que os marcadores estudados eram suficientemente estáveis e sensíveis e permitiam a deteção de sangue (14). Porém, a utilização do mRNA nas ciências forenses apresenta limitações, uma vez que a adição de outros fatores ambientais como a humidade, radiações ultravioleta (UV), alterações de temperatura e pH podem influenciar a estabilidade dos marcadores de mRNA independentemente do tempo de exposição da amostra, afetando a integridade e a reprodutibilidade dos resultados (10,12,16).

Recentemente, os miRNAs surgiram como uma nova classe de biomarcadores com potencial aplicabilidade na área das ciências forenses. A maioria dos miRNAs são encontrados intracelularmente, porém, um número significativo, tem sido observado em circulação, também denominado de miRNAs circulantes ou extracelulares. Desde que foram descobertos surgiram várias evidências que demonstraram que os miRNAs são estáveis em vários fluídos biológicos (17,18). Quando comparado com o mRNA, os perfis de expressão de miRNAs apresentam várias vantagens de utilização em contextos forenses. Devido ao seu tamanho pequeno são mais estáveis, o que os torna menos suscetíveis à degradação química e/ ou física; são mais específicos e sensíveis, pelo que apresentam um maior potencial discriminatório quando se trata da identificação de amostras biológicas alteradas por fatores ambientais; são específicos de fluídos biológicos; e ainda circulam associados a proteínas ou incorporados em microvesículas (6,7,16,19,20). Devido a todas estas características, vários autores consideraram que os miRNAs poderiam ser potenciais biomarcadores para a identificação de fluídos biológicos (5,9,10,12,21).

1.2. microRNAs

Os miRNAs são uma classe de pequenas moléculas de RNA não codificante (*non-coding RNA*: ncRNA), com um comprimento de 18-25 nucleótidos, de cadeia simples, que regulam a expressão génica por regulação seletiva de sequências de mRNAs, levando à sua degradação ou bloqueio a nível pós-transcricional, dependendo do grau de complementaridade entre os miRNAs e a sequência de mRNA alvo (22,23).

Há medida que são descobertas novas sequências de miRNAs, estas são sequencialmente numeradas e inseridas numa base de dados oficial, a miRBase, que é o principal repositório *online* que contém os dados relativos a todas as sequências de miRNAs conhecidas (16,24). Os últimos resultados publicados descrevem 24 521 *loci* de miRNAs provenientes de 206 espécies, dos quais 1917 pertenciam à espécie humana (25). Atualmente a miRBase conta com 38 589 miRNA loci provenientes de 271 espécies (26).

A biogénese dos miRNAs ocorre através de múltiplos passos que envolvem a maturação dos precursores de miRNAs (pre-miRNAs), a montagem do miRNA maduro em complexos microprocessadores e a regulação da expressão de genes codificantes ao degradar ou bloquear a tradução de mRNAs alvo (16).

Numa primeira fase, o miRNA é transcrito no núcleo pela RNA polimerase II (RNA Pol II) num precursor de miRNA primário (pri-miRNA). A maior parte dos miRNAs são transcritos pela RNA Pol II, porém, uma pequena fração é transcrita pela RNA polimerase III (RNA Pol III) (27–30). De seguida, é produzido um precursor de miRNA (pre-miRNA), com aproximadamente 70-100 nucleótidos, pela enzima *Drosha*, uma ribonuclease III, e pela proteína do domínio dsRNA (*double-stranded ribonucleic RNA*), a proteína *DGCR8* (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*). A *DGCR8* interage com a *Drosha*, formando um complexo proteico, e estabiliza-a de forma a esta poder interagir de forma estável e direta com os pri-miRNA (27–30). Os pre-miRNAs são ativamente exportados para o citoplasma pelo recetor exportador do núcleo Exportina-5 (XPO5), e depois processados pela proteína *Dicer*, endoribonuclease III, em associação com um parceiro de proteína de ligação de RNA de cadeia dupla chamada TRBP (*transactivation-responsive RNA-binding protein*), resultando numa pequena estrutura de RNA de cadeia dupla com 22 nucleótidos, um miRNA maduro (16,27–30). Durante este processo a TRBP recruta uma proteína da família das Argonautas (AGO), a Argonauta 2, uma RNase (ribonuclease) cataliticamente ativa, e, juntamente com a *Dicer*, formam um complexo trimérico que inicia a montagem do *RNA-induced silencing complex* (RISC). Apenas uma das cadeias do duplex de miRNA maduro é que é incorporada no RISC, a cadeia guia, e é selecionada pela proteína Argonauta com base na estabilidade termodinâmica da extremidade 5', sendo a outra degradada. Depois de incorporada no RISC, o miRNA orienta o complexo para os seus alvos de mRNA por emparelhamento de bases. A cadeia do complexo de miRNA que permanece estritamente ligada ao RISC representa o miRNA maduro funcional que irá atuar nos mRNAs alvo. A extensão do emparelhamento de bases entre o miRNA e os alvos e mRNAs determinam se o mRNA é degradado ou se é reprimida a sua tradução (Figura 1) (16,27–30).

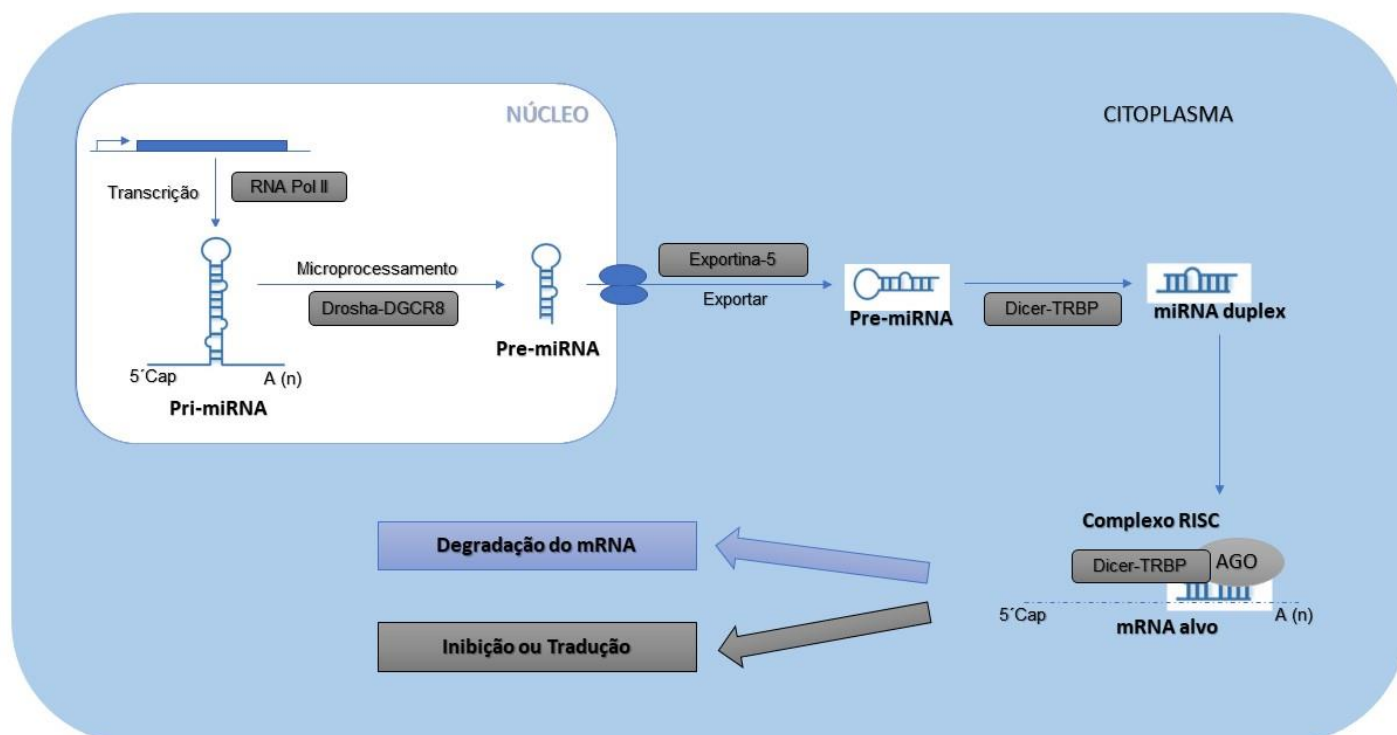


Figura 1 - Representação esquemática da biogênese de miRNAs.

Depois da descoberta dos miRNAs e da sua identificação em órgãos, tecidos, células e fluídos biológicos, estes têm sido identificados como principais reguladores em vários processos biológicos incluindo o desenvolvimento, a diferenciação, apoptose e proliferação celular (22). Consequentemente, já existem inúmeros estudos que associam a sua expressão a diferentes condições patológicas como a inflamação, a diabetes e o cancro (17,31,32).

A expressão dos miRNAs é dinâmica, uma vez que cada miRNA é capaz de regular até 100 mRNAs diferentes, e que mais de 10 000 mRNAs parecem ser diretamente regulados por miRNAs (23).

1.3. Aplicabilidade dos miRNAs na Medicina Legal

Atualmente existem alguns requisitos que os potenciais biomarcadores de identificação de amostras biológicas devem cumprir de forma a, posteriormente, virem a ser reconhecidos como tal. Weber e colaboradores, definiram um conjunto de características que um biomarcador tem de apresentar para ser considerado como ideal (Tabela 3) (31).

Tabela 3 - Características que um biomarcador ideal num biomarcador ideal deve apresentar para ser usado na identificação de fluídos biológicos (11) (31).

Biomarcador forense ideal
Inalterado por fatores físicos e/ou químicos
Durabilidade nas amostras
Detetado por métodos não invasivos
Específico de um fluído biológico
Método de deteção rápido, simples e preciso
Método de deteção reprodutível e económico

Em 2009, Hanson e colaboradores foram os primeiros a realizar um estudo em que se avaliou a expressão de miRNAs em fluídos biológicos relevantes na medicina legal (10). O objetivo do seu estudo era identificar miRNAs que apresentassem especificidade em diferentes fluídos biológicos. Esta especificidade ocorre quando um certo miRNA é específico de um tecido corporal ou fluído biológico e não é encontrado noutro, ou quando os seus níveis de expressão são significativamente elevados num tipo de amostra e acentuadamente mais baixos noutras, podendo permitir a diferenciação de fluídos biológicos humanos como o sangue, o sangue menstrual, o sêmen, a saliva e secreções vaginais (10,11).

No estudo de Hanson, de entre os vários miRNAs testados, o miR-451 e o miR-16 apresentavam níveis de expressão muito superiores no sangue comparativamente aos restantes fluídos utilizados, tendo sido por isso considerados possíveis biomarcadores de sangue (10).

Num estudo mais recente, Zubakov estudou os níveis de expressão de vários miRNAs e concluiu também que o miR-451 apresentava elevados níveis de expressão em sangue comparando com outros fluídos, reforçando assim o seu potencial como biomarcador de sangue (12).

Porém, apesar dos estudos mencionados anteriormente apresentarem resultados concordantes, o mesmo não acontece com outros miRNAs associados a outros tipos de fluídos biológicos (5,33). Esta realidade poderá dever-se ao facto de os estudos realizados terem utilizado diferentes metodologias, o que contribuiu para que os resultados de expressão dos miRNAs entre os diferentes fluídos fossem diferentes, havendo poucos miRNAs confirmados por mais do que um estudo. A falta de resultados homogéneos e não reprodutíveis dos diferentes estudos deve-se ao facto de utilizarem

abordagens diferentes mesmo pretendendo atingir o mesmo objetivo, criando assim a necessidade de padronizar os procedimentos técnicos para caracterização dos miRNAs como biomarcadores (9–12). Para além disto, uma possível limitação destes estudos deve-se ao facto de não existirem estudos em que seja mencionada a influência do fator tempo nos níveis de miRNAs, e do fator tipo de suporte em que a amostra foi recolhida.

Apesar das diferenças entre os vários estudos realizados, existem várias características que revelam que os miRNAs são muito estáveis nos fluídos biológicos (20). Muitos dos fluídos biológicos, são conhecidos por apresentarem RNases, o que sugere que os miRNAs segregados se encontram empacotados de alguma forma, para se protegerem contra a digestão da RNase (7). Turchinovich e os seus colaboradores afirmaram que os miRNAs extracelulares se encontram encapsulados em microvesículas, porém, também podem circular livres ou associados às proteínas Argonauta (AGO), ou ainda podem ser incorporados em partículas *high-density lipoprotein* (HDL). No entanto, não são totalmente claros os mecanismos envolvidos nestes processos (20). Adicionalmente, o pequeno tamanho dos miRNAs maduros e a sua forte relação com o complexo RISC contribuem para uma menor suscetibilidade à degradação causada por fatores ambientais físicos e/ou químicos como humidade, radiação UV, temperatura, pH e outros fatores, que normalmente degradam o mRNA, dificultando o trabalho dos investigadores (7,11,16,19).

1.4. miRNAs como potenciais biomarcadores de identificação de amostras de sangue

Recentemente, vários investigadores realizaram estudos de modo a estabelecerem uma relação entre os padrões de expressão específicos de miRNAs e a identificação de fluídos biológicos (Figura 2) (11). Foram realizados vários estudos para identificar miRNAs específicos de fluídos biológicos (5,9,10,12,21,31).

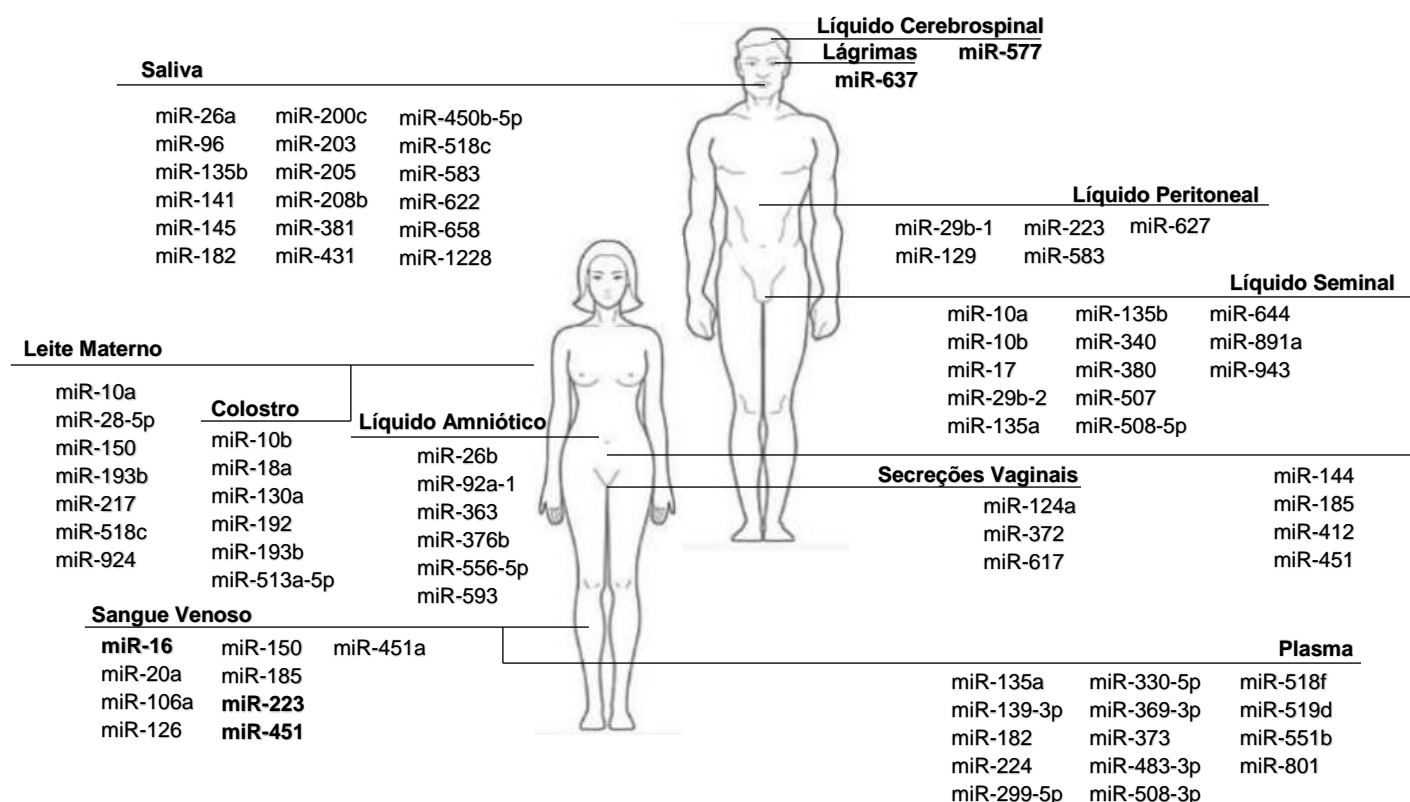


Figura 2 - Revisão de todos os miRNAs considerados possíveis biomarcadores de fluidos biológicos (adaptada de S. Silva et al (13)).

Hanson e os seus colaboradores demonstraram que os miRNAs podem ser extraídos de amostras forenses, e examinaram a expressão de 452 miRNAs em amostras de sangue, saliva, sêmen, secreções vaginais e sangue menstrual. Estes autores, identificaram 9 miRNAs, e entre eles os miR-451, miR-16 que são diferencialmente expressos em amostras biológicas forenses, e comprovaram a sua capacidade para identificar fluidos biológicos (10). Todos os miRNAs foram testados em todos os fluidos biológicos mencionados, e verificou-se que o miR-451 foi encontrado em elevados níveis no sangue e no sangue menstrual quando comparando com amostras de sêmen, saliva e secreções vaginais. Para além do miR-451, também o miR-16 foi encontrado em níveis elevados no sangue. Os autores concluíram que estes miRNAs eram fortes candidatos a biomarcador para o sangue (10).

Também Zubakov em 2009, analisou a expressão de 718 miRNAs em amostras de saliva, sêmen, secreções vaginais, sangue menstrual e sangue venoso (as mesmas que Hanson utilizou) (12). Porém, apenas foi possível a identificação de marcadores candidatos para as amostras de sangue venoso e sêmen, uma vez que estas amostras não se encontram expostas a fatores de degradação e foram armazenadas durante um

ano. Zubakov conseguiu replicar os resultados de Hanson em relação ao sangue venoso, mostrando que os miR-16 e -451 eram candidatos a biomarcadores (12).

Num outro estudo de Wang e colaboradores, de 2010, foram utilizadas amostras de sangue venoso, sêmen, secreções vaginais, sangue menstrual, saliva e zaragatoas bucais, e analisados 3 miRNAs, o miR-16, -658 e o -205 (9). Verificou-se que a expressão do miR-16 variou significativamente entre o sangue venoso e os restantes fluídos biológicos, apresentando níveis mais elevados em sangue venoso. Assim, este estudo mostrou que o miR-16 apresentava especificidade em sangue venoso e que era possível ser detetado em amostras de 50 pg de RNA total (9).

Em 2012, Wang realizou um outro estudo, com outros colaboradores, em que analisou a expressão do miR-16 e -486 para sangue venoso e outros miRNAs para outros fluídos biológicos (4). Estes autores verificaram também que o miR-16 apresentava elevados níveis de expressão em sangue venoso. Porém, neste estudo foram utilizadas amostras de 10 pg de RNA total, degradadas e sob condições normais de laboratório durante 1 mês (4).

Mais tarde, Bai e colaboradores testaram 8 miRNAs, entre os quais estavam presentes o miR-16 e -451, em amostras de sangue, sêmen, saliva e secreções vaginais (34). Todos os miRNAs foram quantificados com sucesso e comparados em todos os fluídos biológicos, e concluiu-se que o miR-16 e -451 eram candidatos para amostras de sangue, confirmando-se assim os resultados de outros autores (34).

Também Courts e colaboradores realizaram um estudo em que foi realizada uma triagem global através de análise de *microarray* a 800 miRNAs, e destes foram escolhidos 3 miRNAs candidatos para sangue e outros 3 para saliva (19). De entre os 3 candidatos para sangue encontrava-se o miR-451, e estes foram selecionados por serem miRNAs mais diferencialmente expressos. Também se pôde concluir que o miR-451 era um bom candidato a biomarcador de sangue devido aos seus elevados níveis de expressão quando comparado com a saliva (19).

Num outro estudo, Benson e colegas estudaram a variabilidade dos miRNAs, em sangue total, armazenados até 12 horas à temperatura ambiente e concluíram que os níveis de expressão do miR-16 e do miR-223 não foram alterados pela temperatura ambiente, e estabeleceram que estes miRNAs eram estáveis e que poderiam ser utilizados como miRNAs específicos de plasma (21). Este estudo indicou ainda que o armazenamento do sangue total à temperatura ambiente antes do isolamento do plasma não parece afetar as concentrações plasmáticas de miRNA (21).

Petersen e colaboradores também estudaram a expressão de miRNAs em sangue, saliva e sêmen, e estudaram 10 miRNAs com elevada expressão nas amostras

referidas. Entre os miRNAs estudados, identificaram o miR-451 e o miR-223 como possíveis biomarcadores destes fluídos biológicos (35).

Existem alguns estudos, embora realizados com amostragens pequenas, que comparam os perfis de expressão de miRNAs em amostras de sangue, no entanto, não existem estudos que avaliem a degradação destas amostras ao longo do tempo e o efeito da sua deposição em diferentes suportes físicos. Desta forma, é necessária a realização de estudos adicionais, de modo a compreender o efeito que diferentes tipos de suportes físicos, assim como diferentes períodos de tempo de exposição em condições não controladas, têm no perfil de expressão de miRNAs.

Deste modo, os miR-451, -16 e -223 foram selecionados para o presente estudo, a fim de se avaliar se podem ser considerados miRNAs úteis na medicina legal, nomeadamente na identificação de amostras de sangue periférico depositadas em diferentes suportes físicos e expostas à temperatura ambiente durante vários períodos de tempo.

_____**OBJETIVOS**_____

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal

A validação do potencial dos miRNAs-16, -223, -451 como biomarcadores de identificação de amostras de sangue periférico no âmbito das ciências forenses.

2.2. Objetivos Específicos

- Preparação de cenários experimentais que englobam a deposição de amostra de sangue periférico em diferentes suportes (tecido de algodão, pedra, madeira);
- Extração e purificação dos miRNAs-16, -223 e -451, a partir da amostra de sangue periférico, recolhida dos diferentes suportes nos diferentes intervalos de tempo em que decorreu a experiência;
- Quantificação relativa dos níveis de expressão dos miRNAs-16, -223 e -451 por PCR em tempo-real;
- Determinação da influência dos fatores tipo de suporte físico e tempo de exposição à temperatura ambiente nos níveis dos miRNAs englobados no estudo.

MATERIAL E MÉTODOS



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População de Estudo

Foi realizado um estudo de avaliação do perfil de expressão de miRNAs a partir de amostras biológicas de sangue periférico recolhidas de 4 indivíduos saudáveis do Norte de Portugal. Este grupo inclui indivíduos caucasianos, 2 do género masculino e 2 do género feminino, selecionados de forma aleatória, com uma média de idades de 33,5 anos, e sem condições patológicas declaradas ou conhecidas.

As amostras de sangue venoso periférico (6 mL) foram obtidas por punção venosa antecubital de cada indivíduo, após consentimento informado escrito, de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia.

3.2. Processamento de Amostras

Foi realizada uma recolha de sangue (1 tubo de cada indivíduo saudável) a 4 indivíduos (2 homens e 2 mulheres), que foram identificados com as letras A, B, C e D, aleatoriamente. De seguida, as amostras foram colocadas em 3 tipos de suportes diferentes: tecido de algodão, pedra e madeira. Cada tipo de suporte era constituído por 4 exemplares, sendo estes divididos pelos 4 indivíduos. Adicionalmente, também foram extraídos de imediato os miRNAs a partir de amostra de sangue periférico. O desenho do procedimento experimental encontra-se representado na figura 3.

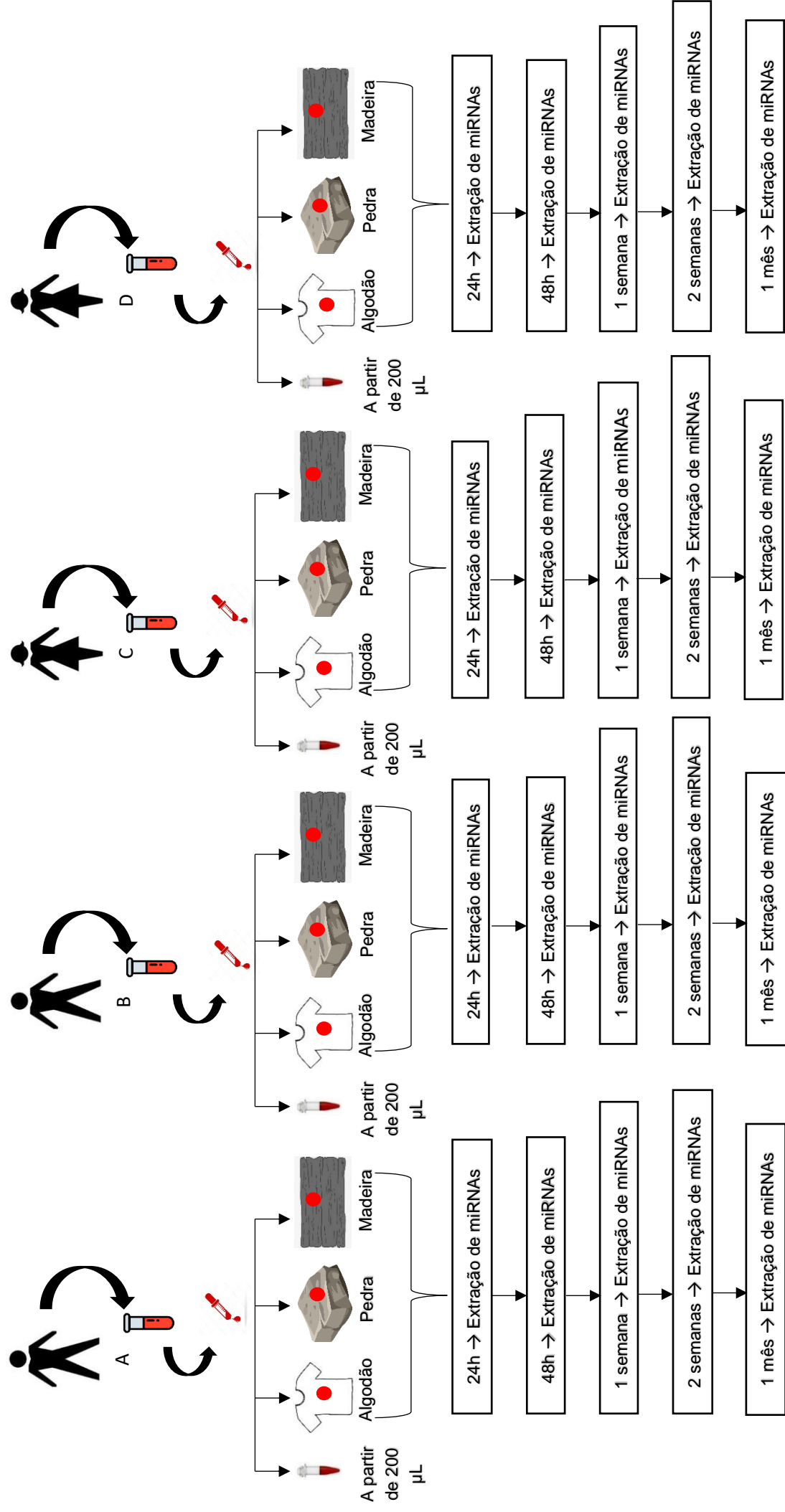


Figura 3 - Desenho do procedimento experimental.

De maneira a evitar a contaminação da amostra a cada extração realizada, foi desenhado, nos suportes de pedra e madeira, um esquema que dividia o suporte em 5 partes (1, 2, 3, 4 e 5), que correspondiam aos tempos de exposição 24 horas, 48 horas, 1 semana, 2 semanas e 1 mês, respectivamente (Figura 4A). Para o suporte tecido de algodão, foi feita uma única mancha para cada indivíduo em retalhos provenientes de uma camisola e, após os vários tempos de exposição eram cortados 2 círculos com cerca de 6mm de diâmetro cada um para posterior extração de miRNAs (Figura 4B). A cada suporte foram adicionadas algumas gotas de sangue e, por fim, foram colocadas à temperatura ambiente e recolhidas após os diferentes tempos de exposição.

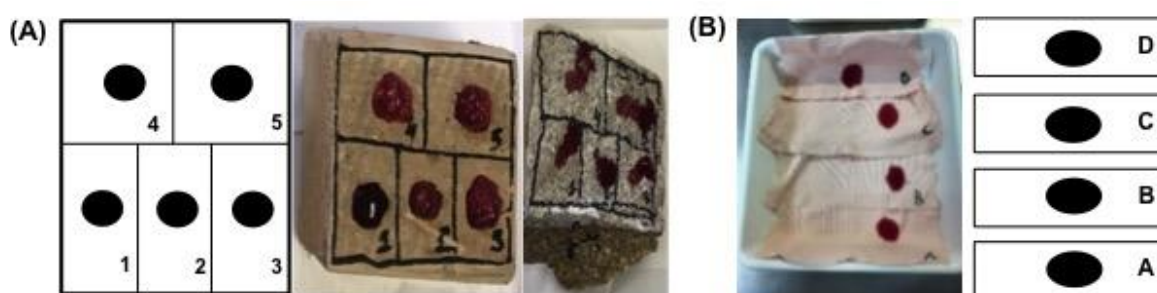


Figura 4 – Esquemas utilizados nos suportes madeira e pedra (A) e no suporte algodão (B) para recolha da amostra de sangue nos diferentes tempos estabelecidos para a experiência.

3.3. Extração de microRNAs

A extração de miRNA a partir de amostras de sangue, foi realizada com recurso ao GRS microRNA *Purification Kit* (Grisp® Research Solutions), após otimizações do procedimento, de modo a obter uma melhor recuperação da amostra inicial e aumentar o rendimento da extração. Nomeadamente à amostra inicial, recolhida com zaragatoa, foram adicionados 30 µL de *miRNA Buffer* e 300 µL de fenol-clorofórmio, e de seguida centrifugada a 15.000g durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, seguiram-se as recomendações do fabricante (Anexo 1).

Após a extração, a concentração e a pureza do RNA foram medidas, a 260 nm e 280 nm através da utilização do espectrofotómetro *Nanodrop® ND-1000* (Thermo Scientific®).

3.4. Síntese de cDNA e quantificação relativa por PCR em tempo real

As amostras de miRNA foram depois utilizadas como moldes para a síntese de cDNA (DNA complementar), usando-se o kit *Taqman® MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems®), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 10x *RT Buffer*, dNTP's (desoxirribonucleótidos trifosfato) misturados com dTTP, RNase inibidor e *MultiScribe™ RT enzyme*, água e ainda primers de sequência específica para os miRNAs-16, -223, -451 e para os controlos endógenos RNU44 e RNU48.

Para a síntese de cDNA, as condições de amplificação foram: 16°C durante 30 minutos, seguidas por 42°C durante 60 minutos e 85°C durante 10 minutos.

A expressão de miRNAs foi analisada por PCR quantitativo em tempo real. As reações foram realizadas no aparelho *StepOne™ qPCR Real-Time*, e continham a 1X *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems®), 1X sondas específicas para amplificar os miRNAs alvo (*Taqman® microRNA Expression Assays®*, miR-16: 000391, miR-223: 002098, miR-451: 001141), amostras de cDNA (3,1 µL por amostra) e os controlos endógenos RNU44 (RNU44: 001094, Applied Biosystems®), e RNU48 (RNU48: 001006, Applied Biosystems®). Durante a amplificação qPCR, as amostras foram sujeitas a temperaturas de 95°C durante 20 segundos e depois 40 ciclos de 95°C durante 1 segundo, seguida de 60°C durante 20 segundos. As quantificações de miRNA foram realizadas em duplicado e foi incluído um controlo negativo sem cDNA em todas as reações.

A análise das curvas de amplificação foi realizada utilizando *StepOne™ Software v2.2* (Applied Biosystems®) com a mesma linha de base e limite definido para cada placa, de forma a gerar valores de Ct (*Cycle threshold*) para todos os miRNAs presentes em cada amostra.

Os resultados obtidos às 2 semanas não foram incluídos, uma vez que os resultados neste tempo de exposição apresentavam valores discrepantes, verificando-se que houve um erro durante a extração da amostra.

3.5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software IBM®SPSS®Statistics para Windows (Version 22.0). A quantificação relativa da expressão de miRNAs foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Todos os valores Ct foram utilizados para obter valores de ΔCt para cada um dos miRNAs analisados, segundo a seguinte fórmula:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{miRNA alvo}} - Ct_{\text{endógeno}}$$

De forma a avaliar a diferença dos níveis de expressão dos vários grupos analisados, foi analisada a sua proporção, calculando-se o *fold-change* através da fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \Leftrightarrow \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_x - \Delta Ct_y$$

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Variação do aspeto macroscópico das manchas de sangue periférico

A figura 5 apresenta uma visão geral do registo fotográfico realizado a cada tempo de exposição (amostra a fresco, 24 horas, 48 horas, 1 semana, 2 semanas e 1 mês), com o objetivo de se visualizar, de forma macroscópica, o aspeto das manchas de sangue em cada suporte (tecido de algodão, pedra e madeira) ao longo do tempo.

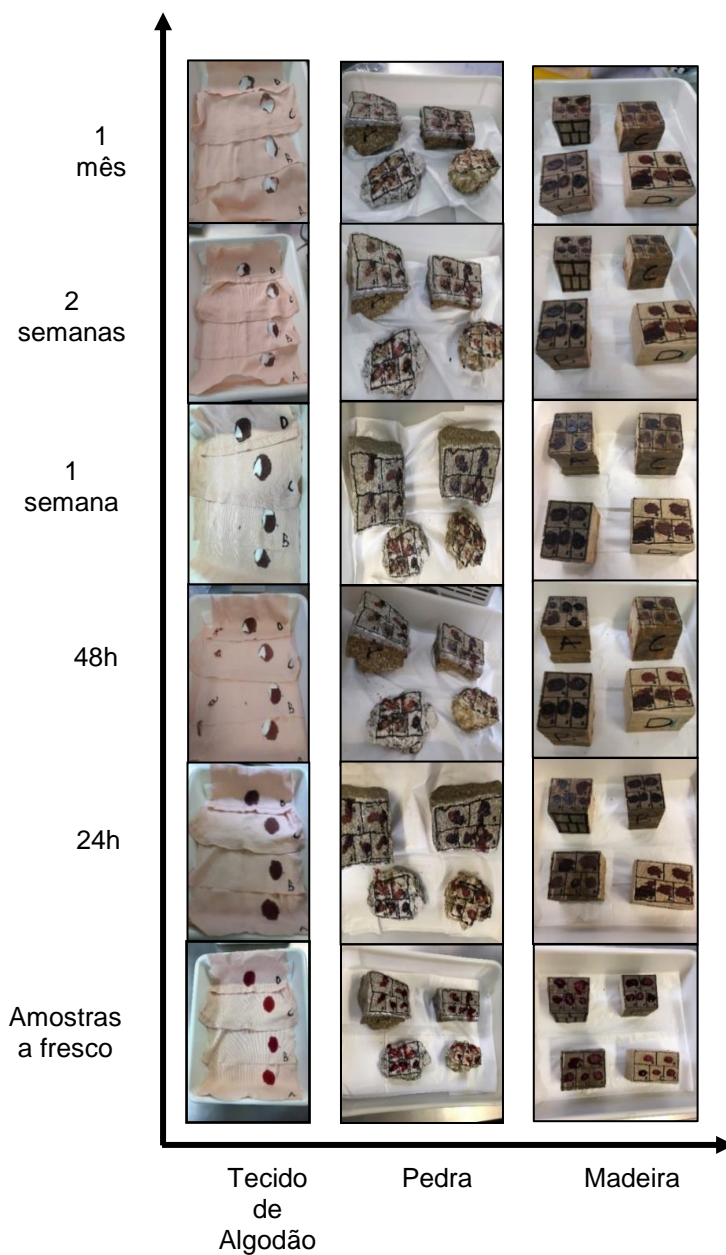


Figura 5 - Variação do estado das manchas de sangue nos suportes algodão, pedra e madeira ao longo do tempo.

4.2. Quantidade de RNA total nos diferentes suportes

As figuras 6, 7 e 8 mostram a quantificação de RNA total a partir das manchas de sangue periférico, depositadas nos diferentes suportes (algodão, pedra e madeira) ao longo dos diferentes tempos de exposição (24 horas, 48 horas, 1 semana, 2 semanas e 1 mês).

Na figura 6 é possível verificar a quantificação de RNA total existente nas amostras de sangue periférico a cada tempo de exposição, para o suporte algodão. De acordo com os resultados obtidos, verificamos que existe uma elevada quantidade de RNA total às 48h (aproximadamente 68 ng/μL), sendo que nos tempos de exposição seguintes as concentrações são ligeiramente mais baixas e semelhantes entre si (45-55 ng/ μL).

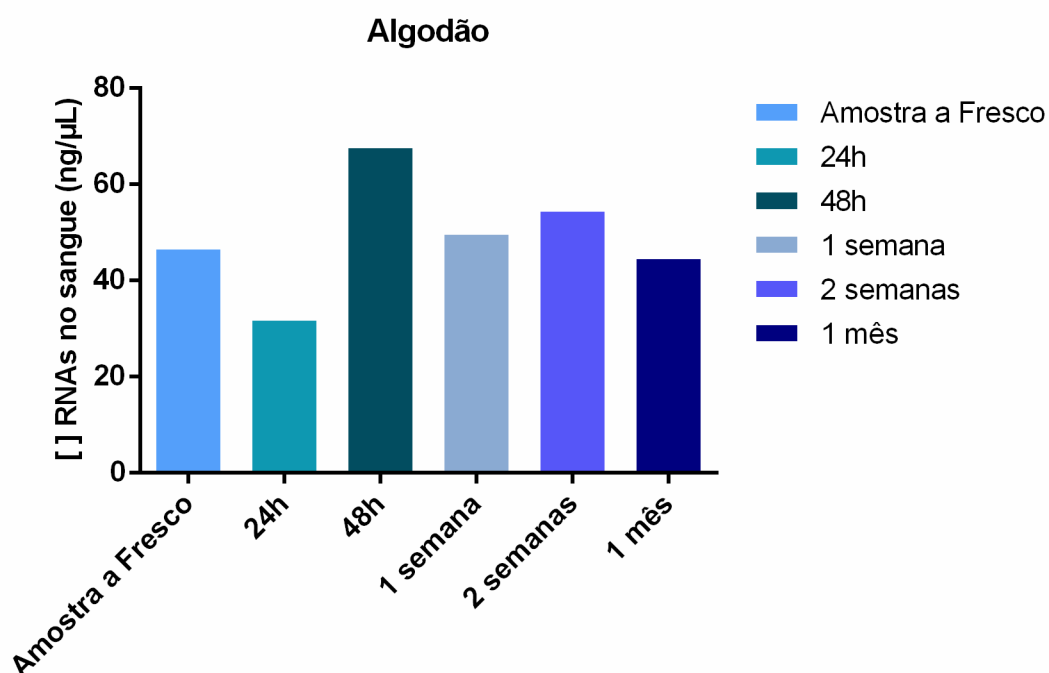


Figura 6 - Detecção da quantidade de RNA total, ao longo dos diferentes tempos de exposição, no suporte tecido de algodão.

A figura 7, mostra a quantificação de RNA total existente nas manchas de sangue a cada tempo de exposição, para o suporte pedra. Analisando os resultados obtidos, podemos verificar que existe uma elevada quantidade de RNA total às 24h (aproximadamente 137 ng/μL), quando comparada com os restantes tempos de

exposição. As restantes concentrações variam entre os 53-83 ng/μL, existindo uma diminuição a partir de 1 semana.

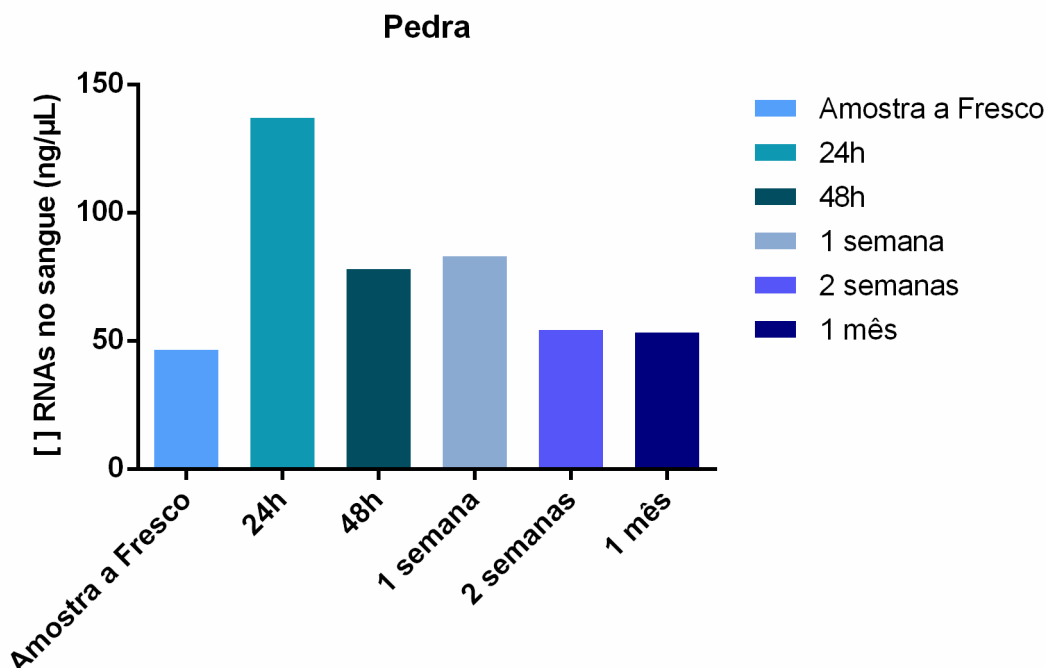


Figura 7 - Detecção da quantidade de RNA total, ao longo dos diferentes tempos de exposição, no suporte pedra.

Na figura 8 é possível observar a quantificação de RNA total existente nas manchas de sangue a cada tempo de exposição, para o suporte madeira. Observando os resultados obtidos, averiguamos que existe uma elevada quantidade de RNA total às 24h (142 ng/μL) e 1 mês depois (126 ng/μL). A concentração nos restantes tempos de exposição apresenta valores próximos (68-71 ng/μL).

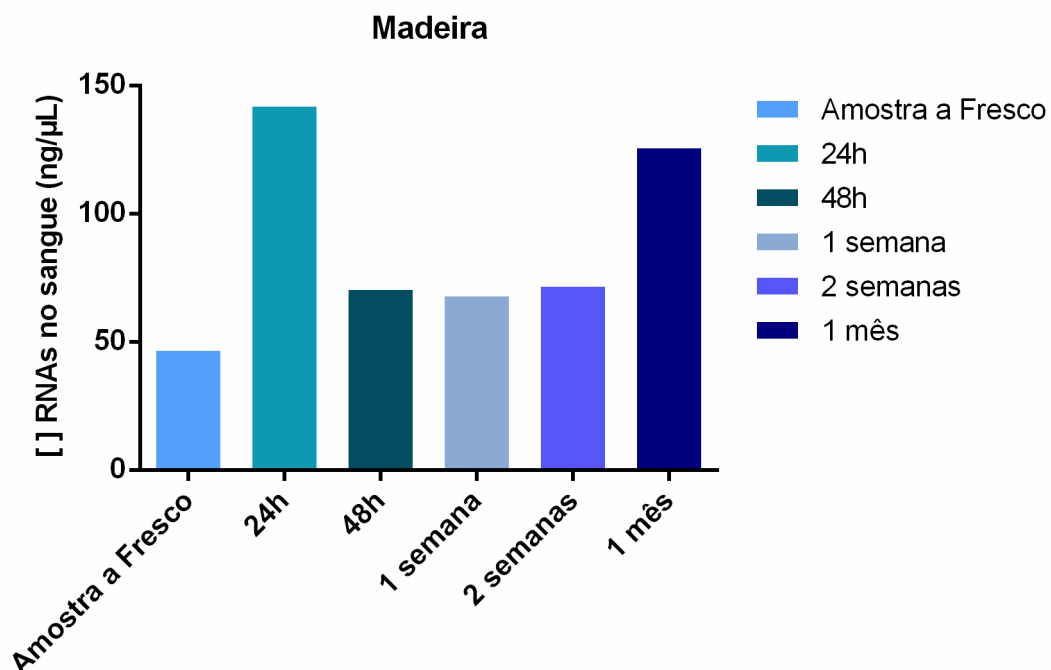


Figura 8 - Detecção da quantidade de RNA total, ao longo dos diferentes tempos de exposição, no suporte tecido de madeira.

4.3. Seleção do controlo endógeno

Os gráficos da figura 9 apresentam a média dos valores de Ct's dos RNU44 e RNU48 utilizados como possíveis controlos endógenos ao longo dos vários tempos de exposição e nos diferentes suportes usados.

Após análise, observamos que existe variação entre as amostras e entre as condições testadas, e que é possível observar que ambos os controlos endógenos apresentam variação. Porém, o que apresenta uma menor variação quando se analisa os diferentes suportes e os diferentes tempos, é o RNU48. Deste modo, este foi o controlo endógeno selecionado para se proceder à normalização dos resultados.

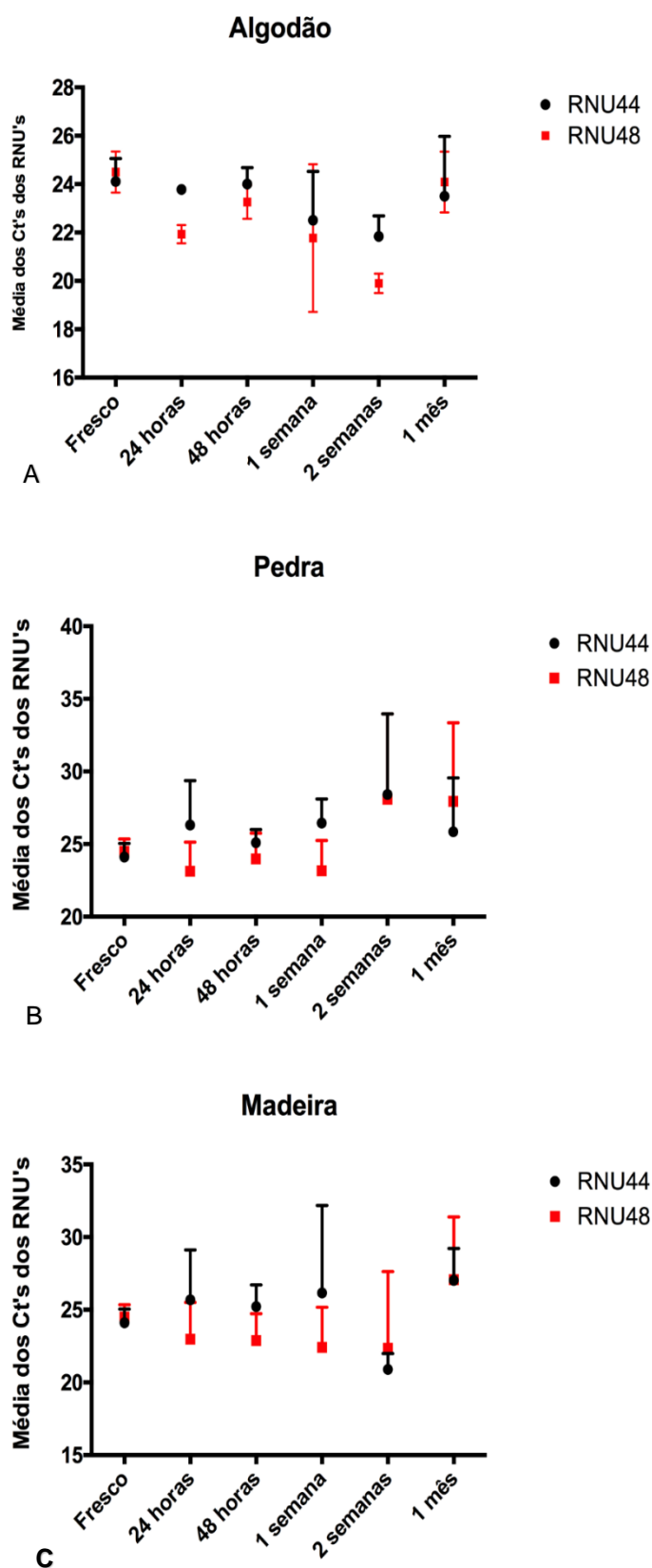


Figura 9 - Média dos Ct's dos RNU44 e RNU48 nos diferentes suportes (algodão, pedra e madeira) e tempos de exposição (fresco, 24h, 48h, 1 semana, 2 semanas e 1 mês).

4.4. Níveis de miR-451, miR-16 e miR-223 nos diferentes suportes físicos

A figura 10 apresenta os níveis de expressão relativa dos miRNAs-451, -16 e -223 em manchas de sangue analisadas em diferentes tempos de exposição, no suporte algodão.

Analisando o gráfico, o miRNA que apresenta um nível de expressão mais estável e constante durante todos os tempos de exposição é o miR-16. Seguindo-se o miR-451, com níveis de expressão próximos em todos os tempos de exposição testados, sendo o valor superior às 24h. Por outro lado, observa-se que o miR-223 apresenta baixos níveis de expressão no suporte algodão. Desta forma, o miRNA que pode ser mais eficientemente detectado no suporte algodão é o miR-16.

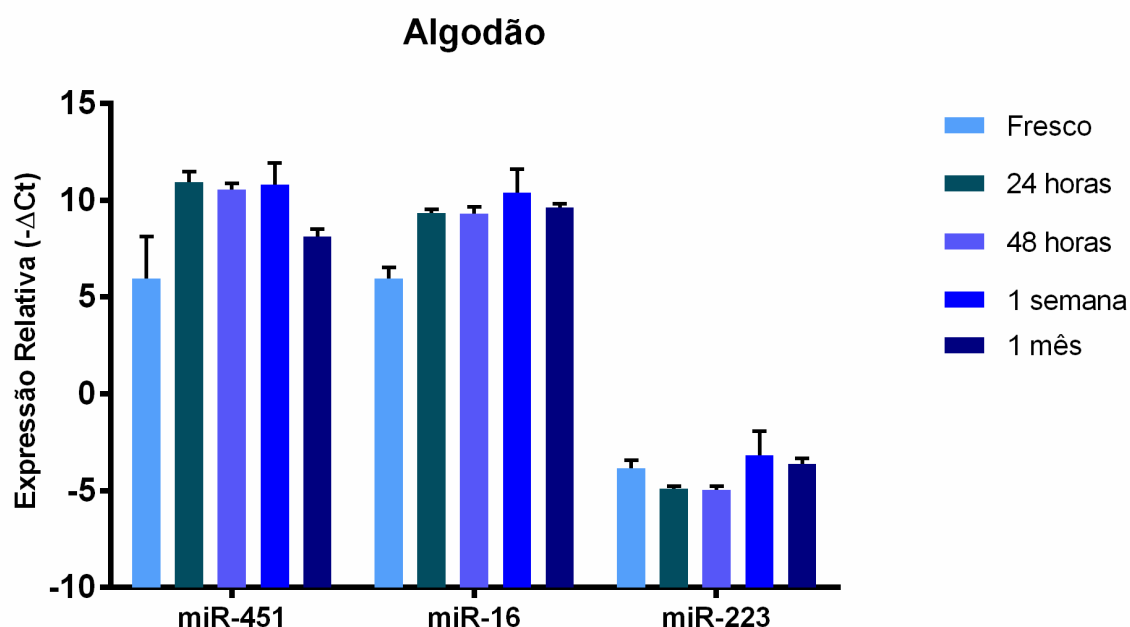


Figura 10 – Níveis de expressão relativa dos miR-451, miR-16 e miR-223 nos diferentes tempos de exposição, no suporte algodão (média \pm erro da média).

Na figura 11 é possível observar os níveis de expressão dos miRNAs-451, -16 e -223 sanguíneos no suporte físico de pedra. Tal como o observado no tecido de algodão, também no suporte pedra, o miR-16 é o miRNA que apresenta níveis mais estáveis nos diferentes intervalos de tempo. Quanto ao miR-451, os níveis de expressão apresentam valores muito próximos em todos os tempos de exposição testados, sendo os níveis mais elevados detectados na condição de 1 mês. Por último, o miR-223 apresenta, mais uma vez, baixos níveis de expressão, sendo que a detecção de níveis mais elevados foi na condição de 1 mês.

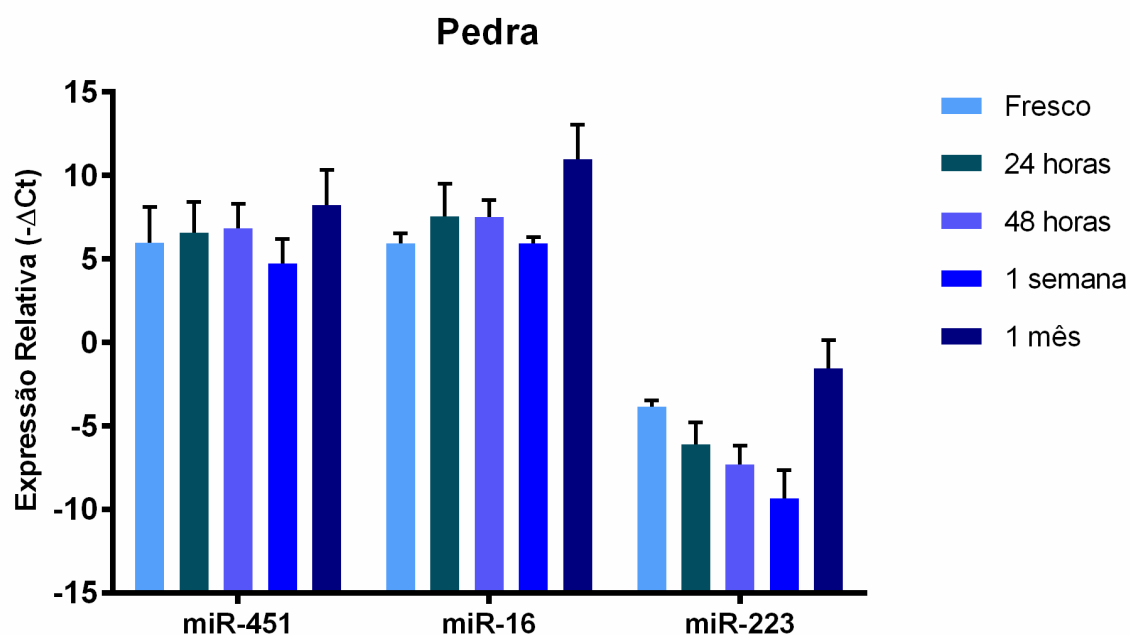


Figura 11 – Níveis de expressão relativa dos miR-451, miR-16 e miR-223 nos diferentes tempos de exposição, no suporte pedra (média \pm erro da média).

Na figura 12 são apresentados os níveis de expressão dos miRNAs-451, -16 e -223 em manchas de sangue analisadas em diferentes tempos de exposição, no suporte madeira. É possível verificar que o miRNA que apresenta um nível de expressão mais estável, neste suporte, é o miR-16. Também com um nível de expressão próximo do miR-16, seguiu-se o miR-451, concluindo-se que este miRNA também apresenta estabilidade. Quanto ao miR-223, este apresenta baixos níveis de expressão relativa no suporte algodão, verificando-se alguma variação dos diferentes tipos de exposição.

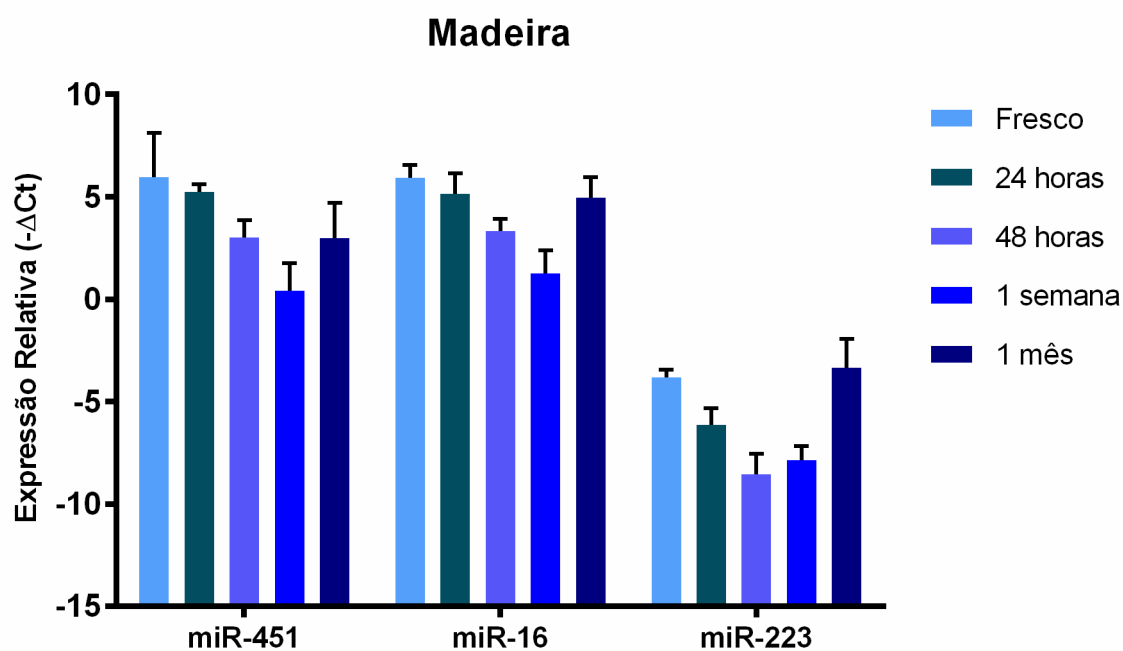


Figura 12 – Níveis de expressão relativa dos miR-451, miR-16 e miR-223 nos diferentes tempos de exposição, no suporte madeira (média \pm erro da média).

De acordo com os resultados, é possível verificar que o miRNA que apresenta uma maior estabilidade nos três suportes (algodão, pedra e madeira) é o miR-16. O miR-451, também apresenta boa estabilidade nos três suportes, sendo os seus níveis de expressão ligeiramente mais baixos que os níveis de miR-16 nos suportes pedra e madeira. Por último, o miR-223 foi o miRNA que apresentou níveis de expressão mais baixos em todos os suportes analisados.

_____**DISCUSSÃO**_____

5. DISCUSSÃO

Na Medicina Legal, é indispensável a procura de um biomarcador rápido e preciso para a identificação de fluídos biológicos. Recentemente, descobriu-se que os miRNAs têm características que os tornam bons candidatos a potenciais biomarcadores de identificação de amostras biológicas. Como tal, a sua análise pode dar-nos informação bastante útil principalmente em amostras que já se encontrem degradadas, e que são frequentemente encontradas em cenários de crime, nas investigações forenses.

Neste estudo, foram analisados os níveis de expressão dos miRNAs-16, -451 e -223 sanguíneos depositados em diferentes suportes (tecido de algodão, pedra e madeira), durante diferentes períodos de tempo (amostra a fresco, 24 horas, 48 horas, 1 semana e 1 mês).

Numa fase inicial, foi necessária a preparação de cenários experimentais em que o objetivo era tentar replicar possíveis condições de um cenário de crime real, nos quais as amostras foram depositadas e mantidas durante diferentes períodos de tempo. A ideia de testar a influência de diferentes suportes materiais na capacidade de conservação dos miRNAs prende-se com o facto da natureza física do suporte onde as amostras são depositadas poder influenciar toda a subsequente análise molecular da amostra, interferindo com os resultados finais obtidos, como já foi demonstrado em casos em que se pretendia quantificar amostras de DNA de determinados suportes. Por exemplo, amostras recuperadas de madeira ou terra, podem proporcionar maus resultados, pois as características de absorção destas, bem como a presença de inibidores podem comprometer reações de PCR (36). No que diz respeito aos miRNAs, até à data, o presente estudo é o primeiro a avaliar a capacidade de conservação e deteção de miRNAs em manchas de sangue depositadas em diferentes suportes ao longo do tempo. Para tal, para além da idealização dos cenários experimentais para a deposição das manchas de sangue, foi também necessária a criação de protocolos experimentais para a extração dos miRNAs a partir das mesmas. Os protocolos utilizados tiveram por base o protocolo de extração de miRNAs a partir de sangue periférico (já estabelecido no nosso grupo) ao qual foram feitas adaptações de modo a otimizar o processo de extração dos miRNAs para cada tipo de suporte (Anexo 1).

Ao longo do estudo, foi feita a observação macroscópica (e respetivo registo fotográfico) da evolução do aspeto das manchas ao longo do tempo e verificamos que o aspeto das manchas de sangue ia ficando cada vez mais escuro.

Após a extração dos miRNAs, e de acordo com os nossos resultados, verificamos que é possível quantificar RNA total (do qual faz parte a fração dos miRNAs), tanto

quando se processa amostras biológicas de imediato (a fresco) ou após 1 mês de deposição nos diferentes suportes, com qualidade e quantidade adequadas para análise.

Isto é, independentemente do tempo em que é feito o isolamento de miRNAs e, independentemente do suporte físico que é utilizado, é possível recuperar miRNAs com bom rendimento (até 1 mês). No entanto, os valores das concentrações do RNA total por vezes deram valores que não seriam os expectáveis, como é o caso da madeira onde a concentração de RNA total quantificada numa mancha com 24 horas era superior à quantificada a partir de 200 µL de sangue fresco, e onde a concentração de RNA total era superior em manchas com 1 mês comparativamente a manchas com 48 horas, 1 semana e duas semanas. Estes resultados podem ser devidos ao facto de existir alguma variação inerente à técnica de recolha das amostras dos vários suportes. Tal como acontece nos cenários de crime, as manchas de sangue não eram todas iguais em termos de tamanho e forma e as superfícies onde foram depositadas também eram irregulares, o que fez com que as zaragoas efetuadas não fossem capazes de recolher a mesma quantidade de amostra no caso das manchas depositadas na madeira e na pedra. No caso das manchas depositadas no tecido de algodão, as diferenças nas concentrações de RNA total podem dever-se ao facto da deposição da mancha no tecido não ser uniforme: a zona central da mancha (onde colocamos as gotas de sangue) absorve uma maior quantidade de amostra comparativamente à zona mais periférica, o que terá implicações na quantidade de RNA total. No entanto, estes resultados vão de encontro a um dos objetivos pretendidos do estudo, uma vez que nos indicam que ao fim de 1 mês de exposição ainda conseguimos quantificar RNA total, e consequentemente, miRNAs. Trata-se de uma vantagem para a medicina legal, uma vez que por vezes não se sabe há quanto tempo é que um crime foi cometido e, para esta análise, não existe a pressão do fator tempo.

Para normalizar os dados do qPCR, foram selecionados controlos endógenos validados de uso comum para avaliar a estabilidade da expressão dos miRNAs em fluídos corporais (12). Os controlos endógenos são moléculas cuja expressão é conservada e que servem para a normalização dos níveis de expressão de moléculas de interesse. No caso dos miRNAs são exemplos de controlos endógenos o RNU24, RNU44, RNU48, RNU6 ou o RNUb6 (12). Alguns dos critérios para a seleção de um bom controlo endógeno incluem níveis de expressão relativamente elevados e constantes, independentemente da origem da amostra (10). Neste estudo, foram utilizados dois controlos endógenos, o RNU44 e o RNU48, com o objetivo de se determinar qual dos dois seria o que apresentava menor variação, e consequentemente, seria o melhor para a normalização dos resultados. Observou-se que ambos apresentavam variação entre as

diferentes amostras e nos diferentes suportes usados. Isto deve-se ao facto de, como mencionado anteriormente, os suportes utilizados (algodão, pedra e madeira) apresentarem propriedades de absorção muito diferentes entre si. De entre os dois controlos endógenos testados, o que apresentou menor variação e, consequentemente, foi utilizado para a normalização dos nossos resultados foi o RNU48.

Depois de analisados os níveis de expressão relativa dos miRNAs-451, -16 e -223 nos diferentes suportes físicos, verificou-se que no algodão o miRNA que apresentava um nível de expressão mais estável é o miR-16, com valores mais estáveis entre os diferentes tempos de exposição. O miR-451 também apresentava níveis de expressão elevados, apresentando também estabilidade neste suporte. Quanto ao suporte pedra, o miRNA que apresentava menor variação de níveis de expressão é, igualmente ao suporte anterior, o miR-16. No entanto, neste suporte, embora o miR-451 também esteja presente em bastante quantidade, a sua estabilidade diminui. Relativamente ao suporte madeira, o miR-16 é o que apresentava maiores níveis de expressão e, consequentemente, maior estabilidade. Segue-se o miR-451 que também mostrava alguma estabilidade neste suporte. Assim sendo, concluímos que o miR-16 era o que apresenta maior estabilidade em todos os suportes. Ao contrário deste, o miR-223, embora, esteja presente em todos os suportes, apresenta níveis de expressão baixos, sendo o menos abundante.

Estes resultados conduzem a outra grande vantagem para a medicina legal, que tem a ver com o facto de conseguirmos detetar miRNAs, que sabemos que estão presentes em amostras de sangue, em diversos suportes frequentemente encontrados em cenários de crime. Mesmo em casos em que a mancha é muito pequena, se se tratar de uma amostra de sangue, futuramente vai ser possível comprovar a sua natureza ao detetarmos estes miRNAs, principalmente o miR-16 e o miR-451 que apresentaram níveis de expressão mais elevados.

Percebe-se ainda, através dos resultados obtidos, que o tipo de suporte em que é recolhida a amostra não cria muitas dificuldades na deteção de miRNAs. O mesmo não aconteceria com o DNA, uma vez que o tipo de suporte utilizado iria interferir com a qualidade dos perfis obtidos. A madeira, por exemplo, seria um mau suporte a utilizar para a deteção de DNA devido às suas características de absorção, e ainda poderia contribuir para a sua degradação (36).

Na literatura não existem estudos que avaliem as condições dos miRNAs, testadas em vários tipos de suportes e em diferentes tempos de exposição. Uma vez que uma investigação criminal pode levar algum tempo a ser resolvida, era importante perceber se os miRNAs podem permanecer em boas condições de armazenamento a médio e longo prazo. Assim, existem estudos anteriores que tentaram perceber se os

miRNAs poderiam ser ou não detetados em diferentes condições de armazenamento a médio e longo prazo. De acordo com o estudo de Grasedieck e colaboradores, foram testados 4 miRNAs para avaliar o efeito do armazenamento de miRNAs em soro humano a -80°C (com e sem descongelamento), -20°C (com ou sem descongelamento), e à temperatura ambiente, sendo o miR-451 um dos miRNAs estudados (37). Os autores concluíram que não foi verificada nenhuma diferença significativa nos níveis de miRNAs quando as amostras eram armazenadas entre os -80°C e -20°C num armazenamento de curto prazo (10 dias). Contudo, quando armazenados à temperatura ambiente, os níveis de miRNAs diminuem, embora ainda detetáveis. Além disso, o ciclo repetido de congelamento e descongelamento também diminuiu significativamente os níveis de miRNAs comparando com o armazenamento contínuo, o que mostrou resultados inconsistentes com trabalhos de outros autores (38–40). Para um armazenamento a médio prazo (<20 meses) não foram observadas diferenças significativas nos níveis de miRNAs extraídos nas condições de -80°C e -20°C. Adicionalmente, eles exploraram também o efeito causado pelo armazenamento a longo prazo a -20°C e observaram um ligeiro decréscimo na faixa de 2-4 anos; depois de 6 anos de armazenamento é observado um decréscimo significativo nos níveis de miRNAs (37). Ou seja, os autores concluíram que os miRNAs presentes no soro humano parecem quase não ser afetados pelas temperaturas de congelamento (-20°C) durante pelo menos 2-4 anos de armazenamento, contudo são necessários mais estudos do gênero para outros fluidos biológicos, pois podem não responder da mesma maneira ao armazenamento a baixa temperatura (11)(37). O nosso estudo analisou os miRNAs em amostras de sangue periférico, e mostrou que estes são estáveis a médio prazo (até 1 mês), à temperatura ambiente em diferentes tipos de suportes.

O presente estudo está de acordo com as conclusões obtidas em outros estudos relativamente aos miRNAs testados. Quanto ao miR-16 a ao miR-451, este estudo comprova os resultados obtidos por Hanson e os seus colaboradores em que é referido que estes foram encontrados em elevados níveis no sangue e que eram fortes candidatos a biomarcadores para o sangue (10). Também Zubakov realizou um estudo em que replicou os resultados de Hanson e os considerava marcadores de sangue (12). Wang e colaboradores analisaram o miR-16, em dois estudos independentes, e em ambos se verificou que este miRNA apresentava especificidade no sangue e que era possível de ser detetado em pequenas quantidades de amostra (4,9). O nosso estudo vai totalmente de encontro às conclusões de Wang, uma vez que se observou que dos três miRNAs testados, o miR-16 é o que apresentava maior estabilidade, independentemente do suporte utilizado. Este estudo confirma ainda os resultados de Bai e colaboradores

que concluíram que os miR-16 e -451 eram bons candidatos para amostras de sangue, corroborando já na altura, estudos anteriores (34). Tal como o nosso estudo indica que o miR-451 também é um bom candidato a biomarcador de sangue devido aos elevados níveis de expressão, também Courts o afirmou num estudo realizado (19). Para além disto, observou a especificidade deste miRNA para o sangue quando comparado com a saliva (19). Benson e Petersen realizaram estudos em que mencionavam que o miR-223 era estável em plasma e amostras de sangue, saliva e sémen, podendo ser um possível biomarcador destes fluídos. No entanto, os nossos resultados indicam que o miR-223 poderá não ser um bom biomarcador de manchas de sangue, uma vez que foi detetado em baixas quantidades, tanto nas amostras de sangue a fresco como nas manchas estudadas. Porém, é de ressaltar que este miRNA pode apresentar quantidades superiores em amostras de saliva, ou em outros fluídos biológicos, sendo necessários mais estudos para validar esta hipótese.

Em suma, o presente estudo propõe a utilização dos os miR-16 e miR-451 como potenciais biomarcadores de identificação de manchas de sangue, uma vez que é possível a sua análise a partir de diferentes suportes e em diferentes tempos após a deposição da amostra de sangue.

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Num cenário de crime podem ser encontrados vários tipos de fluídos biológicos, sendo que entre os mais comuns se encontra o sangue. No entanto, por norma, as manchas encontram-se em quantidades muito pequenas ou então apresentam algum estado de degradação. Assim, torna-se difícil conseguir obter um perfil de DNA. Como tal, começou a utilizar-se, na Medicina Legal, a análise de miRNAs uma vez que estava descrito que apresentavam potencial para ajudar na identificação de fluídos biológicos, quer devido ao seu tamanho intrinsecamente pequeno, quer devido à sua especificidade de tecidos. Desta forma, começaram a ser estudados vários miRNAs com o objetivo de se encontrarem características que os tornassem potenciais biomarcadores estáveis de vários fluídos biológicos. Embora já existam estudos que sugiram os miRNAs como potenciais biomarcadores de amostras de sangue, é importante continuar a estudá-los de forma a validar resultados anteriores e assim estabelecer novos biomarcadores de identificação de manchas em cenários forenses.

O presente estudo verificou a importância dos miR-16, -451 e -223 como potenciais biomarcadores de sangue, mas acrescentou variáveis não testadas anteriormente que incluem a análise dos miRNAs em diferentes suportes (tecido de algodão, pedra e madeira) sujeitos a diferentes tempos de exposição (amostra a fresco, 24 horas, 48 horas, 1 semana e 1 mês). Concluiu-se então que o miR-16 apresenta elevados níveis de expressão, e constantes, em todos os suportes analisados, verificando-se a sua elevada estabilidade. Quanto ao miR-451, também apresenta níveis elevados de expressão nos diferentes suportes, revelando também a sua estabilidade. No entanto, o miR-223 apresentou baixos níveis de expressão em todos os suportes, mostrando-se ser o menos abundante de todos os miRNAs testados.

As diferenças obtidas entre os três miRNAs analisados, permitiram-nos concluir que o miR-16 é o que apresenta maior estabilidade em amostras de sangue, independentemente do suporte em que a amostra possa estar depositada, e, como tal, podemos não só validar a sua potencialidade como identificador de amostras de sangue, como ainda concluir que este é mesmo um biomarcador estável para este efeito. O miR-451 também apresenta grande estabilidade em amostras de sangue em todos os suportes, validando-se o seu potencial como biomarcador de amostras de sangue. Contudo, os valores baixos dos níveis de expressão do miR-223 permitem-nos concluir que este não será um potencial biomarcador para a identificação de manchas de sangue.

Para além disto, ainda podemos concluir que o tipo de suporte em que é recolhida a amostra não interfere com a consequente deteção de miRNAs, uma vez que em todos eles é possível essa deteção ao longo de todos os tempos testados.

No entanto é importante mencionar que os resultados obtidos apresentam alguns vieses. Nomeadamente, o facto de a técnica de recolha das amostras dos suportes ter sido diferente entre as várias recolhas. Isto aconteceu uma vez que os suportes utilizados não eram todos iguais e as manchas depositadas apresentavam diferentes formas e tamanhos, o que se traduziu em diferentes quantidades de amostra extraída. Estes vieses são complicados de ultrapassar uma vez que, em cenários de crime reais, as manchas encontradas também apresentarão tamanhos e características distintas. Por outro lado, em estudos futuros que visem determinar as alterações nos níveis de expressão dos miRNAs em diferentes suportes ao longo do tempo será necessária a utilização de suportes cujas réplicas apresentem o mesmo tamanho, forma e características morfológicas e ainda ser depositada exatamente a mesma quantidade de amostra inicial. Adicionalmente existe ainda a necessidade de criação de kits específicos para a extração de miRNAs a partir de manchas de fluídos biológicos que permitam a padronização do método de deteção, de forma a ser replicado em estudos futuros e potenciais cenários de crime.

Futuramente, seria também interessante replicar o presente estudo utilizando uma mistura de fluídos (e não apenas manchas derivadas amostras de sangue), uma amostragem maior e mais variedade de suportes. O objetivo será verificar se os miRNAs que estudamos, o miR-16, -451 e -223, continuam a ser detetados, e em que quantidades, e também validar os resultados obtidos no presente estudo.

Os miRNAs podem, de facto, vir a fazer parte, num futuro próximo, do dia-a-dia de um laboratório forense, para permitir e ajudar a identificar amostras de sangue provenientes de cenários de crimes.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Harbison S, Fleming R. Forensic body fluid identification: state of the art. *Res Reports Forensic Med Sci* [Internet]. 2016;Volume 6:11–2. Available from: <https://www.dovepress.com/forensic-body-fluid-identification-state-of-the-art-peer-reviewed-fulltext-article-RRFMS>
2. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int*. 2009;188(1–3):1–17.
3. Luo XY, Li ZL, Peng D, Wang L, Zhang L, Liang WB. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from miRCURY™ LNA array. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2015;5:e630–2.
4. Wang Z, Zhang J, Luo H, Ye Y, Yan J, Hou Y. Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet*. 2013;7(1):116–23.
5. Sirker M, Fimmers R, Schneider PM, Gomes I. Evaluating the forensic application of 19 target microRNAs as biomarkers in body fluid and tissue identification. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2017;27:41–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.11.012>
6. Dumache R, Rogobete AF, Sandesc D, Bedreag OH, Ciocan V, Muresan C, et al. Use of Circulating and Cellular miRNAs Expression in Forensic Sciences. *J Interdiscip Med* [Internet]. 2017;2(3):235–41. Available from: <http://content.sciendo.com/view/journals/jim/2/3/article-p235.xml>
7. Da Rocha Navega SA. Extracellular microRNAs in forensic sciences: potential biomarkers for body fluid identification. 2015;
8. Li Y, Wang Z, Hou Y. MiR16 as a microRNA marker applied in species identification. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2011;3(1):e313–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigs.2011.09.019>
9. Wang Z, Luo H, Pan X, Liao M, Hou Y. A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2012;6(3):419–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.008>
10. Hanson E, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2009;2(1):503–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.037>
11. Silva SS, Lopes C, Teixeira AL, Sousa MJC De, Medeiros R. Forensic miRNA: Potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet*. 2015;14:1–10.
12. Zubakov D, Boersma AWM, Choi Y, Van Kuijk PF, Wiemer EAC, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med*. 2010;124(3):217–26.
13. An JH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. Body fluid identification in forensics. *BMB Rep*. 2012;45(10):545–53.

14. Zubakov D, Kokshoorn M, Kloosterman A, Kayser M. New markers for old stains: Stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *Int J Legal Med.* 2009;123(1):71–4.
15. Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, Van IJcken W, Kayser M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int J Legal Med.* 2008;122(2):135–42.
16. Courts C, Madea B. Micro-RNA - A potential for forensic science? *Forensic Sci Int [Internet]*. 2010;203(1–3):106–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.002>
17. Liang H, Gong F, Zhang S, Zhang CY, Zen K, Chen X. The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014;5(2):285–300.
18. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen [Internet]*. 2011;717(1–2):85–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.004>
19. Courts C, Madea B. Specific micro-RNA signatures for the detection of saliva and blood in forensic body-fluid identification. *J Forensic Sci.* 2011;56(6):1464–70.
20. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: The mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci [Internet]*. 2012;37(11):460–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2012.08.003>
21. Benson EA, Skaar TC. Incubation of whole blood at room temperature does not alter the plasma concentrations of microRNA-16 and -223. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(10):1778–81.
22. Dias F, Teixeira AL, Santos JI, Gomes M, Nogueira A, Assis J, et al. Renal cell carcinoma development and miRNAs: A possible link to the EGFR pathway. *Pharmacogenomics.* 2013;14(14):1793–803.
23. Teixeira AL, Dias F, Gomes M, Fernandes M, Medeiros R. Circulating biomarkers in renal cell carcinoma: the link between microRNAs and extracellular vesicles, where are we now? *J Kidney Cancer VHL [Internet]*. 2014;1(8):84–98. Available from: <http://jkcvgl.com/index.php/jkcvgl/article/view/19/63>
24. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(SUPPL. 1):1–6.
25. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(D1):68–73.
26. <http://www.mirbase.org/>.
27. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M, Division B, Hutchinson F, Health P, et al. HHS Public Access. 2015;13(5):358–69.
28. Cortez MA, Bueso-ramos C, Ferdin J, Lopez-berestein G, Anil K, Calin GA. NIH Public Access. 2012;8(8):467–77.
29. Friedländer MR, Lizano E, Houben AJS, Bezdan D, Báñez-Coronel M, Kudla G, et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biol.* 2014;15(4):1–17.

30. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2010;1803(11):1231–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.013>
31. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. HHS Public Access. 2016;56(11):1733–41.
32. MacFarlane L-A, R. Murphy P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* [Internet]. 2010;11(7):537–61. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2029&volume=11&issue=7&spage=537>
33. Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*. 2012;7(7).
34. Bai P, Deng W, Wang L, Long B, Liu K, Liang W, et al. Micro RNA profiling for the detection and differentiation of body fluids in forensic stain analysis. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2013;4(1):e216–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.111>
35. Petersen CH, Hjort BB, Tvedebrink T, Kielpinski LJ, Vinther J, Morling N. Body fluid identification of blood, saliva and semen using second generation sequencing of micro-RNA. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2013;4(1):e204–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.105>
36. Butler J. *Forensic DNA Typing*. 2nd ed. 2005. 688 p.
37. Grasedieck S, Schöler N, Bommer M, Niess JH, Tumani H, Rouhi A, et al. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia*. 2012;26(11):2414–6.
38. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008;105(30):10513–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804549105>
39. Shen J, Todd NW, Zhang H, Yu L, Lingxiao X, Mei Y, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Lab Invest* [Internet]. 2011;91(4):579–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2010.194>
40. Gidlöf O, Andersson P, Van Der Pals J, Götzberg M, Erlinge D. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology*. 2011;118(4):217–26.

----- **ANEXOS**

8. ANEXOS

ANEXO 1

Situações Problema: AMOSTRAS A FRESCO

1. Colocar 200 µl de sangue num tubo *eppendorf*;
2. Adicionar 30 µl de **miRNA Buffer** e 300 µl de fenol-clorofórmio a cada amostra e vortexar durante 15 segundos;
3. Centrifugar a amostra a 12.000g durante 15 minutos a 4°C (usar centrífuga refrigerada).
Nota: Colocar o **miRNA Elution Buffer** a aquecer a 65°C (50 µl por cada amostra)
4. Transferir a fase aquosa para um novo tubo *eppendorf*;
5. Adicionar 35% do volume recuperado de etanol absoluto e misturar no vórtex;
6. Transferir o conteúdo do *eppendorf* para uma coluna e incubar 1 minuto à temperatura ambiente;
7. Centrifugar a 15.000g (a 4°C) durante 30 segundos;
8. Descartar o tubo coletor e adicionar 70% do volume total de etanol absoluto;
9. Transferir para uma nova coluna e incubar 1 minuto à temperatura ambiente;
10. Centrifugar a 15.000g durante 30 segundos (a 4°C);
11. Descartar o *flowthrough* do tubo coletor e adicionar 200 µl de **Wash Buffer**;
12. Incubar 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugar 1 minuto a 15.000g (a 4°C);
13. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna num tubo *eppendorf*. Adicionar 50 µl de **miRNA Elution Buffer** (pré-aquecido a 65°C);
14. Incubar 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugar 3 minutos a 15.000g à temperatura ambiente;
15. Descartar a coluna e armazenar o *eppendorf* (que contém o miRNA purificado) a -80°C.

Situações Problema: PEDRA E MADEIRA

Parte I:

1. Colocar duas a quatro gotas das amostras problema numa pedra e num pedaço de móvel, de forma a surgir uma mancha;
2. Deixar secar à temperatura ambiente;
3. Deixar passar 24h, 48h, 1 semana, 2 semanas e 1 mês.

Parte II:

Ao fim de cada *timepoint* estabelecido (24h, 48h, 1 semana, 2 semanas e 1 mês):

1. Humedecer um cotonete esterilizado (zaragatoa estéril), de uma única utilização num tampão de lise;
2. Passar o cotonete, em movimentos circulares suaves de forma a entrar em contacto com a mancha;
3. Adicionar 200 µl de tampão de lise num tubo *ependorf*;
4. Utilizando técnicas estéreis, cortar a ponta do algodão e colocar no tubo *ependorf* que contém o tampão de lise;
5. Vortexar suavemente e incubar durante 10/15 minutos à temperatura ambiente.

Parte III:

1. Adicionar **300µL** de **clorofórmio** e **30µL** de **miRNA Buffer**. Vortexar durante 15 segundos;
2. Incubar a amostra durante 10 minutos em gelo;
3. Centrifugar a amostra a 15.000g durante 10 minutos (usar centrífuga refrigerada a 4°C). Colocar o **miRNA Elution Buffer** a aquecer a 65°C (**50µL** por cada amostra);
4. Retirar a fase aquosa para um novo tubo *ependorf*;
5. Adicionar **108µL** de **etanol absoluto** e misturar no vórtex;
6. Transferir o conteúdo do *ependorf* para uma coluna e incubar 1 minuto à temperatura ambiente;
7. Centrifugar a 15.000g (a 4°C) durante 30 segundos;
8. Adicionar 70% do volume total de **etanol absoluto**;

9. Transferir tudo para uma nova coluna e incubar 1 minuto à temperatura ambiente;
10. Centrifugar a 15.000g durante 30 segundos (a 4°C);
11. Descartar o *flowthrough* e adicionar **200µL de Wash Buffer**;
12. Incubar 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugar 1 minuto a 15.000 g (a 4°C);
13. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna num tubo *eppendorf*. Adicionar 50µL de **miRNA Elution Buffer** (pré-aquecido a 65°C);
14. Incubar 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugar 3 minutos a 15.000g à temperatura ambiente;
15. Descartar a coluna e armazenar a amostra a -80°C.

Situações Problema: TECIDO DE ALGODÃO

Parte I:

1. Colocar duas a quatro gotas das amostras problema em algodão, de forma a surgir uma mancha;
2. Deixar secar à temperatura ambiente;
3. Deixar passar 24h, 48h, 1 semana, 2 semanas e 1 mês.

Parte II:

Ao fim de cada *timepoint* estabelecido (24h, 48h, 1 semana, 2 semanas e 1 mês):

1. Foram coletadas 2 amostras de pequenos círculos com 6mm de diâmetro de locais aleatórios da mancha;
2. Os dois círculos foram reidratados em 200 µl de tampão de lise durante 10/15 minutos, à temperatura ambiente e submetidos de seguida a vórtex durante 10 segundos.

Parte III:

1. Adicionar **300µL de clorofórmio** e **30µL de miRNA Buffer**. Vortexar durante 15 segundos;
2. Incubar a amostra durante 10 minutos em gelo;

3. Centrifugar a amostra a 15.000g durante 10 minutos (usar centrífuga refrigerada a 4°C). Colocar o **miRNA Elution Buffer** a aquecer a 65°C (50µL por cada amostra);
4. Retirar a fase aquosa para um novo tubo *eppendorf*;
5. Adicionar **108µL de etanol absoluto** e misturar no vórtex;
6. Transferir o conteúdo do *eppendorf* para uma coluna e incubar 1 minuto à temperatura ambiente;
7. Centrifugar a 15.000g (a 4°C) durante 30 segundos;
8. Transferir o filtrado para um novo tubo *eppendorf* e adicionar 70% do volume total de **etanol absoluto**;
9. Transferir tudo para uma nova coluna e incubar 1 minuto à temperatura ambiente;
10. Centrifugar a 15.000g durante 30 segundos (a 4°C);
11. Descartar o *flowthrough* e adicionar 200µL de **Wash Buffer**;
12. Incubar 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugar 1 minuto a 15.000 g (a 4°C);
13. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna num tubo *eppendorf*. Adicionar 50µL de **miRNA Elution Buffer** (pré-aquecido a 65°C);
14. Incubar 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugar 3 minutos a 15.000g à temperatura ambiente;
15. Descartar a coluna e armazenar a amostra a -80°C.